

**Untersuchungen
über die Kernverhältnisse
und morphologischen Eigenschaften
symbiontischer Mikroorganismen
bei verschiedenen Insekten**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München**

**vorgelegt
von
Gertrud Kolb**

**aus
Konstanz**

Oktober 1958

**Berichterstatter: 1. Prof. Dr. Anton Koch
2. Prof. Dr. Karl Ritter von Frisch**

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 1958



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555227_0082

Aus dem Zoologischen Institut der Universität München

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE KERNVERHÄLTNISSE UND
MORPHOLOGISCHEN EIGENSCHAFTEN SYMBIONTISCHER
MIKROORGANISMEN BEI VERSCHIEDENEN INSEKTEN

Von
GERTRUD KOLB

Mit 27 Textabbildungen in 85 Einzeldarstellungen

(Eingegangen am 25. Januar 1959)



Inhaltsübersicht

	Seite
I. Einleitung und geschichtlicher Überblick	2
II. Material und Methode	4
1. Haltung und Züchtung	4
a) <i>Camponotus ligniperda</i> LATR. S. 4. — b) <i>Aphrophora salicis</i> DE G. S. 4. — c) <i>Pediculus vestimenti</i> BURM. S. 5. — d) <i>Oryzaephilus surinamensis</i> L. S. 5. — e) <i>Calandra oryzae</i> L. S. 5. — f) <i>Ceratitis capitata</i> WIED. S. 5.	
2. Bakteriologische Technik und Histologie	5
<i>A. Camponotus ligniperda</i> LATR.	
I. Biologie von <i>Camponotus</i>	6
II. Untersuchungen mit dem Phasenkontrastmikroskop	7
III. Intravitalfärbungen	10
IV. Die Bakteriennatur der Endosymbionten	10
1. Allgemeine Charakterisierung	10
2. Kernfärbungsmethoden an fixierten Symbionten	11
a) HCl-Giemsa-Färbung nach PIEKARSKI-ROBINOW S. 12. — b) Fermentative Untersuchungen S. 12. — c) Behandlung mit Perchlorsäure nach CASSEL S. 14. — d) Modifizierte Robinow-Färbung nach MUDD und SMITH S. 14.	
V. Die Symbionten während der Entwicklung des Wirtes	15
1. Larven	15
2. Puppen	18
3. Jungimagines	22
4. 4wöchige Imagines	26
5. 8wöchige Imagines	29
6. Imagines im Winterschlaf	32
7. 26wöchige Imagines	33
8. 30wöchige Imagines	33
9. 34wöchige und ältere Imagines	34
10. Diskussion	34
VI. Degeneration der symbiontischen Mikroorganismen	40
VII. Ovarialinfektion und Entwicklung der Symbionten	44
VIII. Jahreszeitliche Untersuchungen	48

	Seite
B. <i>Aphrophora salicis</i> DE G.	
I. Die symbiontischen Einrichtungen	51
II. Die Symbionten	51
1. Ergebnisse der HClO_4 -Methode	51
2. Ergebnisse der HCl-Giemsa-Methode	52
3. Untersuchungen mit Ribonuclease	53
4. Feulgensche Nuclealreaktion an Schnitten	53
5. Zur Cytochemie der Hauptsymbionten	53
III. Diskussion	55
C. Verschiedene Insekten	
1. <i>Pediculus vestimenti</i> BURM. S. 56. — 2. <i>Oryzaephilus surinamensis</i> L.	
S. 58. — 3. <i>Calandra oryzae</i> L. S. 59. — 4. <i>Ceratitidis capitata</i> WIED.	
S. 60.	
Abschließende Diskussion	61
Zusammenfassung	64
Literatur	65

I. Einleitung und geschichtlicher Überblick

In den letzten Jahrzehnten mehrten sich die Arbeiten, die sich mit dem Nachweis eines dem Kern höherer Organismen zu vergleichenden Äquivalentes bei Bakterien bemühten. Man versuchte, durch Färbung mit Anilinfarbstoffen und mittels der Feulgenschen Nuclealreaktion — die darauf beruht, daß die Bindung der Desoxyribose an die Stickstoffbase von schwachen Säuren angegriffen wird und so die frei werdende Aldehydgruppe mit Fuchsin in schweflicher Säure (Schiffs Aldehydreagens) eine rote Färbung ergibt — das Problem zu lösen. Doch die zahlreichen Untersucher erhielten anfänglich gänzlich widersprechende Ergebnisse. Bei gewöhnlicher Bakterienfärbung mit Anilinfarbstoffen (Gentianaviolett, Kristallviolett, Parafuchsin) erzielte man meistens stark homogen gefärbte Mikroorganismen und schloß daraus, daß die kernähnlichen Substanzen diffus über das ganze Bakterium verteilt sein müßten. NEUMANN (1930), THOMAS (1930), STAPP und BORTELS (1931) und PIETSCHMANN und RIPPEL (1932) versuchten dann, mit der Feulgenreaktion zum Ziele zu kommen. Aus ihren Färbungsergebnissen schlossen auch sie auf diffuse Verteilung der kernähnlichen Substanz.

Andere Autoren (KUCELA 1930, POKROWSKAJA 1931, IMSENECKI 1934 (zitiert n. IMSENECKI 1936), MILOVIDOV 1935, SCHAEDE 1939 und MEYER-PIETSCHMANN 1946) kamen nach Anwendung der Nuclealreaktion auf Bakterien zu dem Schluß, daß die Kernsubstanz in ihnen diffus verteilt ist, doch während bestimmter Phasen der Entwicklung ein Kern ausgebildet sei. Auch gelegentlich feulgenpositiv reagierende Körnchen wurden beschrieben.

Doch erst 1937 gelang es PIEKARSKI und STILLE, unabhängig voneinander, mittels der Feulgenschen Nuclealreaktion kernähnliche Strukturen zum erstenmal elektiv darzustellen. PIEKARSKI nannte sie Nucleoide. Auch ROBINOW (1942), VENDRELY und TULASNE (1946), MALMGREN und HEDEN (1947), BOIVIN u. Mitarb. (1947) und DELAPORTE (1950) bestätigten, daß die Bakterienleiber keine diffuse Nuclealreaktion ergeben, sondern daß kernähnliche, feulgen-positive Körper in jeder Zelle vorkommen. — NEUMANN (1941) und STAPP (1942) schlossen sich dann auch der Auffassung dieser Gruppe an und führten ihre früheren Ergebnisse auf eine mangelhafte Präparationstechnik zurück.

Charakteristisch für diese Nucleoide ist, daß sie Träger der Desoxyribonucleinsäure (DNS) sind, die ja auch für die Chromosomensubstanz tierischer und pflanzlicher Zellen typisch ist. Vergleichen wir nun aber die Größenverhältnisse tierischer Zellen mit jenen von Bakterien, so werden die Schwierigkeiten verständlich, die bei einer chemischen Umsetzung auftauchen müssen. Die Nucleinsäuren zeigen eine sehr starke Affinität zu den basischen Farbstoffen, so daß intensive Färbungen erzielt werden. Neben der Desoxyribonucleinsäure enthalten sowohl die Bakterien als auch die Zellen höherer Organismen die Ribonucleinsäure (RNS). Letztere tritt vor allem im Cytoplasma der Bakterienzelle reichlich auf und unterliegt je nach dem Alter derselben mitunter mengenmäßig sehr starken Schwankungen. Um die Desoxyribonucleinsäure färbereich nachzuweisen, muß erst die Ribonucleinsäure entfernt werden. Dies wird erreicht:

1. durch Hydrolyse mit normaler Salzsäure bei 52—56° C oder mit Perchlorsäure bei 4—8° C;
2. durch fermentativen Abbau der Ribonucleinsäure durch Ribonuclease (RN-ase);
3. bei Bakterienkulturen durch völligen Entzug von stickstoffhaltigen Substanzen im Medium.

Stehen dabei Hydrolysezeit, Temperatur und Färbezeit im richtigen Verhältnis und wird die schonendste Fixierung angewandt, so gelingt eine optimale Färbung der Desoxyribonucleinsäure. Aus der früheren Unkenntnis dieser wichtigen Zusammenhänge ist es auch erklärlich, daß aus den Ergebnissen der Feulgenfärbung auf diffuse Verteilung der Desoxyribonucleinsäure geschlossen wurde.

Heute bestehen kaum noch Zweifel darüber, daß die gewöhnlichen, in Kulturen züchtbaren Bakterien kernähnliche Substanzen, die sog. Kernäquivalente, enthalten. Diese zeigen, je nach Art und Alter, morphologische und topographische Verschiedenheiten, und bis heute ist man sich über ihre Feinstruktur im lebenden Bakterienleib noch nicht einig, denn auch bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen muß man Artefakte berücksichtigen.

Über die Kernstrukturen symbiontischer Mikroorganismen dagegen ist bis jetzt nur sehr wenig bekannt. RIZKI (1954) gelang es bei den Symbionten von *Blattella germanica* eindeutig, feulgen-positive Granula darzustellen; FRANK (1956) wies bei Symbionten von *Periplaneta orientalis* und HUBER (1957) bei solchen von *Mesocercus* als Kernäquivalente zu deutende Strukturen nach. An den Symbionten von *Philaenus spumarius* (RESÜHR 1938), *Pediculus vestimenti* (KOTTER 1955) und *Haematopinus suis* (BEWIG und SCHWARTZ 1956) dagegen konnten bis jetzt keine kernähnlichen Strukturen zur Darstellung gebracht werden.

Diese Arbeit soll nun einen Beitrag dazu leisten, in den Symbionten einiger anderer Insekten die Kernverhältnisse zu klären.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. ANTON KOCH, spreche ich meinen herzlichsten Dank aus für die Anregung zu dieser Arbeit, für sein stetes Interesse am Fortgang der Untersuchungen und für seine allzeitige großzügige Hilfsbereitschaft.

Für die Überlassung des Arbeitsplatzes und die gewährten Unterstützungen schulde ich dem Vorstand des Zoologischen Institutes, Herrn Professor Dr. KARL RITTER v. FRISCH, großen Dank.

Ferner bin ich Herrn Professor Dr. HUGO BRAUN sowie Herrn Professor Dr. GERHARD PIEKARSKI für wertvolle Ratschläge dankbar.

An dieser Stelle sei auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Überlassung von Geräten gedankt.

II. Material und Methode

1. Haltung und Züchtung

a) *Camponotus ligniperda* LATR. Für die laufenden Untersuchungen wurden die Ameisen jeweils frisch aus dem Nest in einer großen Fichte im Forstenrieder Park bei München entnommen. Glastuben, deren Boden zur Wahrung der nötigen Feuchtigkeit mit wasserdurchtränktem Gips versehen war, bewährten sich gut für den Transport der Tiere. Zellstoffbausche dienten als Verschuß.

Da zudem alle Stadien der im Staat vorkommenden Ameisen benötigt wurden, war es notwendig, ein Nest freizulegen. So kam ich in den Besitz von Larven, Puppen, jungen und alten Imagines und von sehr vielen weiblichen geflügelten Geschlechtstieren. Um genau datierte Tiere zu erhalten, setzte ich bestimmte Altersstadien getrennt in Gipsnester ein. Die notwendigen Feuchtigkeitsverhältnisse konnten so leicht den betreffenden Entwicklungsstadien angepaßt werden. Puppen benötigten ein mäßig feuchtes Nest (partielle Anfeuchtung der Gipsnester); Larven dagegen entwickelten sich am besten bei täglich guter Durchtränkung des Gipses. Zur Pflege der Brut setzte ich mehrere alte Arbeiter und Soldaten dazu. — Als Nahrung dienten Zuckerwasser und Holz.

Den größten Teil des Ameisenstaates beließ ich in seinem ursprünglichen Nest, das ich in einem großen Glaszylinder im Laboratorium untergebracht hatte. Diese Tiere waren sehr rege, ernährten sich im Gegensatz zu den Gipsnesttieren außer von Zuckerwasser auch von Insekten, rohem Hackfleisch, etwas Brot und Käse und bekundeten auch rege Bautätigkeit.

Trotz der gleichmäßigen Zimmertemperatur des Laboratoriums verfielen die Tiere des Gipsnestes genauso wie jene des Stammes dem Winterschlaf. Als ich jedoch im Januar aus einem Gipsnest, dessen Tiere sich in offensichtlich festem Winterschlaf befanden, drei „Soldaten“ entnahm, erwachten alle übrigen, und es war unentwegte Bewegung in diesem Nest festzustellen, die für einige Tage anhielt. Von den Tieren im Naturnest ließen sich einmal nur ganz wenige durch die warme Sonnenbestrahlung Ende Februar aus dem Nest locken. Anfang April erwachte der gesamte Staat.

Königinnen bezog ich teils aus dem Forstenrieder Park, teils verdanke ich sie der Liebenswürdigkeit von Herrn Professor Dr. K. GÖSSWALD, Würzburg. Alle Königinnen legten in den Gipsnestern Eier, aber nur wenige pflegten ihre Brut weiter. Die meisten fraßen sie schon nach einigen Wochen.

Präparation. Als das geeignetste Präparationsmedium erwies sich sterile 0,64%ige Kochsalzlösung. Die symbiontenhaltigen Organe wurden mittels feiner Pinzetten herauspräpariert und dann in steriler Kochsalzlösung abgespült. Ein Stückchen des zu prüfenden Organs brachte ich dann in einem Tropfen der Lösung auf ein Deckglas. Mit feinst geschliffenen Nadeln mußten die Gewebstückchen schnell gut zerzupft werden, damit ein möglichst ergiebiger Ausstrich von den Symbionten gelang.

b) *Aphrophora salicis* DE G. Von den Zikaden wurde die Weidenschauzikade *Aphrophora salicis* DE G. untersucht, die von Weiden an der Amper bei München stammte. — In einer Blechbüchse brachte ich die Tiere auf den Weidenzweigen ins Laboratorium. In einer mit nassem Moos ausgelegten und mit einer Glasplatte bedeckten pneumatischen Wanne blieben die Tiere noch ein bis zwei Wochen zu Versuchen verfügbar.

Präparation. Als Präparations-Ausstrichmedium bewährte sich das Gemisch nach RESÜHR am besten:

- 5 cm³ Nordseewasser
- 100 cm³ dest. Wasser
- 6 g Glucose

Ringer- sowie physiologische Kochsalzlösung ergaben sehr starke Deformationen der Symbionten.

c) *Pediculus vestimenti* BURM. Das Material für die Versuche mit *Pediculus* stellte mir freundlicherweise Herr Dr. BAUDISCH zur Verfügung.

Präparation. Mit feingeschliffenen Nadeln wurden die Tiere auf einem kleinen, am Boden eines Embryoschälchens angeklebten, Korken festgesteckt. Die Präparation der Magenscheibe bzw. der Ovarien erfolgte in physiologischer Kochsalzlösung mit feinen Pinzetten und geschliffenen Nadeln. Auch hier war es notwendig, die gekammerte Magenscheibe gut zu zerzupfen, um möglichst viele Symbionten für den Ausstrich zu gewinnen.

Die Eier wurden an verschiedenen Stellen mehrmals angestochen, um bei dem gut ausgebildeten Chorion ein vollständiges Durchdringen mit Fixierflüssigkeit zu garantieren.

d) *Oryzaephilus surinamensis* L. Kulturen dieses Getreideschädlings verdanke ich Herrn Dr. HUGER. Als Zuchtgefäße benützte ich weithalsige Pulverflaschen von 100–200 cm³, die ich mit mehrfach zusammengelegten Leinwandläppchen verschloß und in Thermostaten verwahrte. Als Futter wurden Haferflocken, mit stark ausgemahlenem Weizenmehl vermischt, gereicht. Den Brutschrank hielt ich bei 75–85 % relativer Hydratur und einer konstanten Temperatur von 28° C.

Präparation. Die Symbionten von *Oryzaephilus* s. sind ebenfalls sehr empfindlich. Ringerlösung sowie auch physiologische Kochsalzlösung in verschiedenen Konzentrationen ergaben Deformationen durch Quellung. Leitungswasser, das auf Zimmertemperatur gebracht wurde, eignete sich recht gut als Präparations- und Ausstrichmedium. Die Mycetome waren nur sehr schlecht in dem umgebenden gleichfarbigen Fettkörper zu erkennen. Da das Zerzupfen und Ausstreichen des Mycetoms mittels Nadeln mechanische Deformationen der Symbionten ergab, schlitze ich vorsichtig das Hüllgewebe des Mycetoms mittels einer Nadel auf und schwenkte durch Heben und Senken einer zweiten Nadel, welche unter das Mycetom geführt wurde, die Symbionten heraus.

e) *Calandra oryzae* L. Die Tiere hielt ich in Pulverflaschen von 200 cm³ im Thermostaten meist bei 28° C und 70–85 % RH. Als Nahrung wurden Milokörner (*Sorghum spec.*) und entspelzter Hafer gegeben.

Präparation. Als Präparations- und Ausstrichmedium eignete sich physiologische Kochsalzlösung (1:1) mit destilliertem Wasser verdünnt besser als Leitungswasser. Die Ovarien wurden herauspräpariert, in dem Medium geschwenkt und in einem Tropfen der sterilen Lösung ausgestrichen.

f) *Ceratitis capitata* WIED. Die Mittelmeerfruchtfliege wurde mir von der Landesanstalt für Pflanzenbau und Pflanzenschutz in München überlassen. Ich hielt die Tiere in einem großen Fliegenkäfig. Als Futter wurden Orangen, Mandarinen und Zuckerwasser geboten.

Präparation. Leitungswasser eignete sich besser zum Präparations- und Ausstrichmedium des Darmes als Ringerlösung.

2. Bakteriologische Technik und Histologie

Die Ausstriche wurden, wenn nicht anders angegeben, in Osmiumtetroxyddämpfen noch feucht fixiert. Für spezielle Färbemethoden wurden die Ausstriche in der Flamme oder in Methylalkohol, Formol 4% oder in dem Gemisch nach CHABAUD¹ fixiert. Für Schnittmaterial, wurden die Objekte in den Gemischen von

¹ 60 cm³ 80% Äthanol; 15 mg kristallisiertes Phenol; 5 cm³ 40% Formaldehyd, 2 cm³ Eisessig.

PETRUNKEWITSCH, BOUIN oder CARNOY fixiert. Nach der üblichen Passage über Alkohol, Methylbenzoat und Benzol bettete ich dann in Paraffin ein.

Abweichungen von der üblichen Technik, die sich häufig als notwendig erwiesen, werden im Text gesondert behandelt.

Die Mikraufnahmen wurden teilweise mit einer III f-Leica, größtenteils jedoch mit der Zeiss-Winkel-Aufsatzkamera 6×9 hergestellt, unter Verwendung von Gelb-Grün-Filtern. Alle Einstellungen erfolgten nach dem Köhlerschen Prinzip. — Okular 10×; Immersion H I 90. Silber-Eosinplatten von Perutz und Hauff-Atofin Feinkornentwickler fanden immer Verwendung.

Die Phasenkontrastbeobachtungen wurden mit der Phako-Einrichtung zum Zeiss-Mikroskop Stativ W durchgeführt.

Für die Zeichnungen stand der Abbésche Zeichenapparat zur Verfügung.

A. Camponotus ligniperda LATR.

I. Biologie von *Camponotus ligniperda* LATR.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an *Camponotus* lassen eine kurze Schilderung ihrer Biologie angebracht erscheinen.

Camponotus ligniperda (LATR.), die Roßameise, ist die größte in Deutschland vorkommende Ameise. Durch ihr Minieren in kranken, wie auch gesunden Fichtenbeständen richtet sie beträchtlichen Schaden an. Die Nester beginnen in Wurzeläusläufern oder in der Erde und können sich mehr als einen Meter hoch in vertikalen Kammern im Kernstück des Stammes erstrecken. — Beim Ausheben eines Nestes im Sommer fiel mir auf, daß die einzelnen Entwicklungsstadien der Ameise in verschiedenen Etagen des Nestes untergebracht waren. Im untersten Teil des Baumstumpfes und seinen Wurzeläusläufern fand ich Larven, weiter oben Puppen und junge Imagines und zuoberst, wo die Zahl der Kammern schon gewaltig reduziert ist, überraschte mich eine große Anzahl von weiblichen Geschlechtstieren. Feuchtigkeitsunterschiede im Stamm dürften wohl für dieses Verhalten verantwortlich zu machen sein. Alte Arbeiter und Soldaten waren überall verbreitet.

Bei *Camponotus* erfolgt „unabhängige Koloniegründung“, meist unter einem großen Stein und in der Nähe einer Fichte. Dadurch ist es Aufgabe der Königin, für die ersten Eier und Larven selbst zu sorgen. In etwa 8 Tagen werden von der befruchteten Königin 12—20 Eier gelegt. Nach EIDMANNs Angaben (1928) schlüpfen die Larven in künstlichen Nestern bei +20° C in etwa 5 Wochen aus. Die Dauer des Larvenstadiums ist abhängig von der Menge der verabreichten Nahrung und von der Temperatur. Die anschließende Puppenruhe der Tiere wird mit 9 bis 12 Wochen angegeben. Der gesamte Entwicklungsverlauf ist weitgehend bestimmt von den klimatischen Verhältnissen. Die frisch geschlüpften Imagines sind gelb-braun gefärbt und dunkeln später erst allmählich nach. Im Gipsnest dauert dieser Prozeß nach meinen Beobachtungen etwa 7—8 Monate.

Die Geschlechtstiere schlüpfen im Sommer, überwintern in den Nestern und schwärmen erst im nächsten Sommer zum Hochzeitsflug aus (EIDMANN 1928). Doch ist dazu erwähnenswert, daß ich beim Ausheben eines Nestes im Spätsommer nur weibliche Geschlechtstiere vorfand, während die männlichen Tiere noch im Puppenstadium verweilten. Von 80 untersuchten Puppen aus den verschiedensten Kammern des Stammes war keine weibliche Puppe mit Flügelanlagen mehr zu finden, und das dürfte wohl dafür sprechen, daß die Weibchen sich vor den Männchen entwickeln. Nach dem Hochzeitsflug und erfolgter Begattung schreiten die Weibchen zur Koloniegründung, und die Männchen sterben bald ab. Der Hochzeitsflug findet in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen regional zu verschiedenen Zeiten statt.

Der Größenunterschied zwischen einer Arbeiterin und einem Soldaten ist recht bedeutend, doch vermitteln bei *Camponotus* zahlreiche Übergangsstadien zwischen diesen beiden Kasten. Nach GOETSCH beruht die Ausbildung der Arbeiterkasten auf zwei Momenten:

1. auf der Beschaffenheit des Keimes (blastogen);
2. auf Menge und Art der Ernährung (trophogen).

Für meine Untersuchungen ist weiter von Bedeutung, daß Tiere, die im Frühjahr schlüpfen, zuerst zur Brutpflege herangezogen werden und im Herbst im Außendienst stehen. Imagines, die im Herbst schlüpfen, findet man dann im nächsten Frühjahr im Außendienst.

Für weitere Informationen sei auf die Spezialliteratur verwiesen: H. EIDMANN 1928; K. ESCHERICH 1942; W. GOETSCH 1940 und 1953; H. STITZ 1939.

II. Untersuchungen mit dem Phasenkontrastmikroskop

Um die morphologischen Veränderungen intrazellulärer Symbionten während der ganzen Entwicklung des Wirtstieres verfolgen zu können, war es sehr wichtig, ein Präparationsmedium zu finden, in dem die natürliche Gestalt der Symbionten erhalten bleibt. Dies ist auch für das Studium der feineren cytologischen Verhältnisse unerlässlich, um Artefakte auszuschließen. GIESBRECHT (1957), ein Schüler PIEKARSKI's, weist mit Nachdruck darauf hin, wie sich Strukturen in der Bakterienzelle experimentell allein durch die Einwirkung von Farbstoffen und Chemikalien verändern lassen.

Die trotz Anwendung optimaler gleichbleibender Methoden bei der Fixierung und eventuell auch bei der Färbung auftretenden unvermeidlichen Abweichungen spielen insofern keine Rolle, als sie dann stets konstant in der gleichen Weise auftreten. Aus diesem Grunde wurde das Verhalten der Symbionten in verschiedenen Medien während einer Stunde und länger im Phasenkontrastmikroskop genau verfolgt und verglichen. Dabei zeigten sich im hellen Zelleib, gleich zu Beginn der

Beobachtungen, dunkle rund-ovale Gebilde, die morphologisch und topographisch den später beschriebenen Desoxyribonucleinsäurestrukturen der Salzsäure-Giemsa-Färbung entsprechen. Daraus ist zu sehen, daß eventuelle Abweichungen der Struktur nur ganz geringfügig sind.

Zur Untersuchung bereitete ich eine Symbiontensuspension und beobachtete ihr Verhalten im „hängenden Tropfen“. Luftdichtes Umranden des Deckglases mit Vaseline verhinderte ein Austrocknen des Tropfens und ermöglichte mir Beobachtungen während mehrerer Stunden. Im einzelnen führten die von mir gebrauchten Suspensionsmedien zu folgenden Ergebnissen:

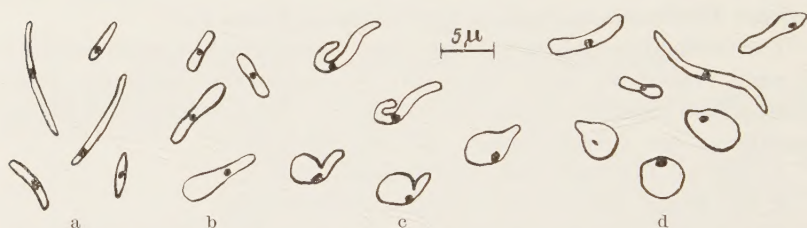


Abb. 1a—d. Lebendbeobachtungen der Symbionten von *Camponotus ligniperda* im Phasenkontrast. a Direkt nach der Entnahme aus den Mycetocyten; b nach 20 min; c nach 35—40 min, und d nach 2 Std

1. In 0,32%iger Kochsalzlösung verhalten sich die Symbionten aus dem Mitteldarmepithel folgendermaßen: Unmittelbar nach der Präparation sind neben etwa $5\text{--}12\mu$ langen, schlanken, stäbchenförmigen Symbionten nur einige wenige kleinere spindelförmige Typen festzustellen (Abb. 1a). Fast alle diese Symbionten besitzen ein rund-ovales Korn, doch finden sich auch solche darunter, die zwei bis acht kettenförmig aneinandergereihte dunkle rundliche Gebilde erkennen lassen (vgl. Abb. 3a).

Nach 20 min aber machen sich die ersten Deformationen an den Bakterienleibern bemerkbar: Einige Symbionten schwellen terminal blasig an, wobei das Granulum in den schmalen Halsteil des so entstehenden flaschenförmigen Gebildes zu liegen kommt (Abb. 1b).

Etwa nach 35—40 min quellen immer mehr der Bakterien, indem sie sich erst schlängeln, dann umschlagen, so daß ein spitzer Winkel gebildet und das Plasma größtenteils an dieser Stelle konzentriert wird (Abb. 1c). Die Tendenz, sich abzukugeln, wird immer deutlicher, wobei das Granulum aber nie zentral zu liegen kommt.

Nach 2 Std erhielt ich bis zu etwa 45% solcher rund-ovaler Formen (Abb. 1d). Die größeren, längeren Symbionten jedoch zeigten sich widerstandsfähiger und behielten selbst nach 1 Std ihre stäbchenförmige Gestalt bei, verbreiterten sich aber später minimal.

2. In Ringerlösung waren die Deformationen ähnlich denen in 0,32%iger NaCl-Lösung, verliefen aber langsamer und waren auch nicht so ausgeprägt.

3. Als das brauchbarste Medium erwies sich 0,64%ige physiologische Kochsalzlösung. Hier begannen die symbiontischen Stäbchen sich erst nach 35 min S-förmig zu winden; sie zeigten aber keine Quellungserscheinungen oder Schrumpfungen. Da diese Lösung annähernd isotonisch ist, wurde sie auch für alle folgenden Präparationen verwendet.

Eigenbewegungen der Bakterien konnte ich nie feststellen. Auch war nie eine nachträgliche Verlängerung der Symbionten zu beobachten, was bestätigt, daß aus den später beschriebenen Riesenformen auf einen natürlichen Pleomorphismus zu schließen ist. — Im allgemeinen sind die Bakterien in diesem Medium als sehr formbeständig zu bezeichnen. Künstliche, morphologische Veränderungen können sich somit bei meinen im folgenden beschriebenen Färbungen an den Symbionten nicht eingestellt haben, weil die gesamte Präparation inklusive des Ausstreichens nur 4—5 min in Anspruch nahm und das Fixieren nach weiteren 5 min bereits abgeschlossen war.

Da während der Entwicklung des Wirtes die Symbionten einen sehr ausgeprägten Pleomorphismus zeigen, kontrollierte ich auch andere Formen der Symbionten aus dem Entwicklungszyklus des Wirtes auf ihr Verhalten gegenüber 0,64%iger Kochsalzlösung. Dabei zeigte sich, daß die breiteren, später noch zu beschreibenden Symbionten (so z. B. Abb. 7a) durchschnittlich bei längerem Aufenthalt in diesem Medium nicht so widerstandsfähig sind, wie die bereits oben beschriebenen Stäbchen (s. Abb. 3a und 23). Bei ersteren führen endständige Quellungen manchmal nach 25 min zu keulenförmigen Gebilden, deren verdickter Teil dann nach oben weiter anschwillt und schließlich scheibenförmige Gebilde ergeben kann. — Die fädigen, schmalen Symbionten verhalten sich wieder anders. Sie biegen sich öfters nach 15 min U-förmig um, wobei sich die freien Enden häufig berühren und so ovale rundliche Ringe entstehen, ohne daß sie vorher aufquellen oder dicker werden. Manche krümmen sich nach 20 min an einem Ende hakenförmig ein.

Nach 50 min schnürten sich verschiedentlich die Bakterien, die endständig etwas keulig geschwollen waren, in ihrer Halspartie durch, und es entstanden so kleine längliche Formen, die aber in ovale Symbionten übergingen. Je länger man beobachtete, desto mehr nahmen diese Kleinformen zu.

Bei all diesen zuletzt beschriebenen Veränderungen blieb jedoch der Großteil der Bakterien selbst nach 65 min noch formkonstant. Die beschriebenen Quellungen traten sehr unterschiedlich auf, und die 0,64%ige NaCl-Lösung erwies sich auch in diesem Fall als geeignetstes Präparationsmedium. — Für die kurze Zeitspanne von etwa 4 min, in

der jeweils die Präparation vor der Fixierung durchgeführt wurde, sind alle angeführten Deformationen also unzutreffend.

III. Intravitalfärbungen

Neben den Phasenkontrastversuchen wurden auch Intravitalfärbungen angestellt. So konnten Redoxvorgänge und damit bestimmte Lebensfunktionen der Bakterien nachgeprüft werden. — Solche Intravitalfarbstoffe färben, wenn sie in geringer Konzentration angewendet werden, die lebende Zelle, ohne sie zu töten oder sonst zu schädigen. Ist das Oxydationsprodukt eines Intravitalfarbstoffes farblos oder von anderer Farbe als die reduzierte Form selbst, so weist der Farbumschlag zwar die Lebenstätigkeit, nicht aber die Lebensfähigkeit der Zelle nach, da Enzyme das Absterben einer Bakterienzelle überdauern können. Alle verwendeten Intravitalfarbstoffe sind in physiologischer Kochsalzlösung löslich.

1. In *Methylenblaulösung* 1:100 000 (in 0,64%iger Kochsalzlösung) färbten sich die Symbionten nach etwa 10 min schwach an, wurden aber dann nach 20—40 min wieder total entfärbt.

Bei Versuchen mit einer Verdünnung von 1:10 000 (in 0,64%iger Kochsalzlösung) ging die Anfärbung schon nach etwa 3—5 min vor sich, doch die Entfärbung begann erst nach etwa 30 min und erfolgte viel langsamer als im vorhergehenden Versuch, bis schließlich nach 2 Std völlige Entfärbung festzustellen war.

2. *Indigotetrasulfonat*lösung (Kaliumsalz) 1:10 000 in physiologischer Kochsalzlösung sowie 1:1000 in destilliertem Wasser verdünnt, färbte die Symbionten so schlecht an, daß sie für unsere Zwecke nicht verwendet werden kann.

3. Auch *Indigodisulfonat*lösung 1:10 000 in 0,64%iger NaCl-Lösung sowie 1:1000 in destilliertem Wasser verdünnt, erwies sich aus demselben Grunde bei diesen Symbionten als unbrauchbar.

4. *Neutralrot* in einer Verdünnung von 1:50 000 (in 0,64%iger Kochsalzlösung) angewendet, färbte nach 5—8 min die Organismen an, und die Entfärbung erfolgte schneller als es bei Methylenblau 1:100 000 der Fall war.

Diese Versuche zeigen also durch die Überführung der Farbstoffe in ihre Leukoform die Redoxvorgänge an und bestätigen damit, daß die Symbionten auch nach der Zerstörung der Mycetocyte noch eine Zeitlang die Enzyme in wirksamer Form enthalten.

IV. Die Bakteriennatur der Endosymbionten

1. Allgemeine Charakterisierung

Zur ersten Orientierung über die wichtigsten Eigenschaften der symbiontischen Mikroorganismen wurden die in der bakteriologischen

Technik üblichen Färbemethoden verwendet. — Das Mitteldarmepithel wurde in einem Tropfen 0,64%iger NaCl-Lösung fein zerzupft und ausgestrichen. Der lufttrockene Ausstrich wurde je nach der Art der anzuwendenden Färbung verschieden fixiert.

Stoffwechsel-physiologische Untersuchungen an den Mikroorganismen konnten nicht durchgeführt werden, da keine Kulturversuche vorgenommen wurden und über die Züchtbarkeit dieser Symbionten bis heute noch nichts bekannt ist.

Im einzelnen ergaben die verschiedenen Färbungen folgende Resultate:

a) **Doppelfärbung nach GRAM.** Die Symbionten aller Entwicklungsstadien des Wirtes, sowie auch jene aus dem Ei verhalten sich eindeutig gram-negativ.

b) **Ziehl-Nelson-Färbung.** Die Symbionten sind nicht säurefest.

c) **Tuscheausstriche** der Symbionten 12wöchiger Imagines wurden luftgetrocknet, in der Flamme fixiert und mit Fuchsin nachgefärbt. Um diese Bakterien bleibt ein ganz schmaler, weißer Saum, der aber nirgends einen „Hof“ bildet. Es handelt sich also um keine Kapselbakterien.

d) Die **Sporenfärbung** nach MÖLLER und RAKETTE sowie in der Modifikation von HABS: negativ. — Es wurden die Symbionten von 12 und 30 Wochen alten Imagines geprüft.

2. Kernfärbungsmethoden an fixierten Symbionten

Die wichtigste all dieser bakteriologischen Untersuchungen stellt der Nachweis von desoxyribonucleinsäurehaltiger Substanz und deren Struktur dar. Dabei war ich bemüht, die verschiedensten Nachweismethoden heranzuziehen, um Fehldeutungen nach Kräften auszuschließen.

Eventuelle Artefakte, die bei der Fixierung oder Hydrolyse möglicherweise entstanden sind, können so mit parallel laufenden anderen Methoden verglichen werden. Positiv wurden nur solche Resultate gewertet, die übereinstimmend bei allen verschiedenen Färbetechniken erzielt wurden.

Über die Morphologie der Nucleoide sowie über die Teilungsprozesse dieser Strukturen in jungen Bakterienkulturen gehen die Meinungen der einzelnen Autoren heute noch sehr auseinander; ich verweise nur auf BISSET (1948, 1949), BOIVIN (1947 und 1948), BRANDES, SCHWARTZ und FLAIG (1955), BRINGMANN (1951), CHANCE (1957), DE LAMATER (1951 und 1954), DELAPORTE (1954 und 1956), GIESBRECHT (1957), HUNTER (1955), KELLENBERGER (1953 und 1955), KNAYSI (1954), KNÖLL und ZAPF (1951), KNÖSEL (1957), KNÖSEL und GÜNTHER (1958),

LARC und MAALÖE (1954), MUDD und SMITH (1949 und 1950), PIEKARSKI (1937, 1940, 1949 und 1950), PIEKARSKI und GIESBRECHT (1956), PIEKARSKI und PONTIERI (1956), ROBINOW (1947), SCHULER (1954), STILLE (1937), PETERS und WIGAND (1953), YUASA, HIRANO, SUZUKI (1954) und YUASA (1955).

Aus diesem Grunde wurde die für die Symbionten anzuwendende Methodik erst an Kulturen des klassischen Versuchsobjektes *Escherichia coli*, bei welchem die gewünschten Stadien gezüchtet werden konnten, erprobt. Erst als daran die von ROBINOW beschriebenen Strukturen erhalten werden konnten, wurde die HCl-Giemsa-Färbung auf die Symbiontenausstriche angewendet.

Für diese Untersuchungen wurden „Soldaten“ im Oktober einem Freilandnest entnommen und die Symbiontenausstriche für sämtliche zu vergleichenden Methoden am selben Tag fixiert, um möglichst einheitliches Bakterienmaterial zu erhalten. Doch erwies sich später gerade dieses Symbiontenstadium aus „Soldaten“ im Oktober als nicht besonders geeignet zur Darstellung der Kernäquivalente.

Es wurden folgende Färbungen zur Darstellung der DNS durchgeführt:

a) HCl-Giemsa-Färbung nach PIEKARSKI-ROBINOW. Sofort nach dem Ausstreichen des herauspräparierten Mitteldarmstückes wurde bei den ersten Versuchen 9 min feucht in OsO_4 -Dampf fixiert. Später erwiesen sich 6 min als genügend, was dann für alle folgenden Versuche, wenn nichts extra erwähnt wird, beibehalten wurde. Die besten Färbungen konnten bei den *Camponotus*-Symbionten erzielt werden bei einer Hydrolysedauer (in n-HCl bei 56°C) von 10–15 min und einer Färbezeit von 35 min. Verwendet wurde eine gepufferte Giemsa-Lösung (4 cm³ Original Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung nach Giemsa der Firma Merck) auf 50 cm³ Pufferlösung ($\text{pH} = 7,2$)¹.

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, erweisen sich bei den Symbionten von *Camponotus*-Soldaten Hydrolysezeiten von weniger als 10 min als unzureichend und solche von mehr als 15 min an als strukturschädigend. Abb. 2a zeigt einige Symbionten nach der HCl-Giemsa-Behandlung.

b) Fermentative Untersuchungen. Zur Beseitigung der störenden Ribonucleinsäure kann der enzymatische Abbau durch Ribonuclease anstatt der HCl-Hydrolyse verwendet werden. — Nach 15 min langer Lufttrocknung wurden die Ausstriche im Gemisch nach CHABAUD fixiert und anschließend in fließendem Leitungswasser $\frac{1}{2}$ –1 Std gewaschen. — Als Fermente standen Pepsin (Merck), Ribonuclease² und Desoxyribonuclease³ zur Verfügung, die teils in 0,01%iger, meistens aber in 0,02%iger Lösung Anwendung fanden.

¹ Pufferlösung ($\text{pH} = 7,2$): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ nach SÖRENSEN 17,101 g; KH_2PO_4 nach SÖRENSEN 5,084 g; dest. H_2O 2000 ml.

² An dieser Stelle sei ganz besonders den Hoechst Farbwerken für die freundliche Überlassung kristallisierter Ribonuclease gedankt.

³ Kristallisierte Desoxyribonuclease (Worthington Inc., Freehold, New Jersey USA).

Tabelle 1. *HCl-Giemsa-Färbung nach PIEKARSKI-ROBINOW*
n-HCl-Hydrolyse bei 56° C

Farbezeiten		5 min	10 min	15 min	20 min	30 min
	20 min	keine distinkte Struktur. Hydrolyse zu kurz	gerade noch gefärbte Struktur erkennbar. Nicht gut.	—	—	
	35 min	Strukturandeutungen schwach und nicht distinkt	beste Struktur-darstellung	gute Struktur	verschwommene Struktur	sehr schlecht! Hydrolyse zu weit fortgeschritten
	40 min	—	Struktur noch gut zu erkennen; aber nicht mehr so distinkt	—	—	—
	45 min	—	etwas überfärbt	—	—	—
	60 min	—	überfärbt	—	—	—
	90 min	—	überfärbt	—	überfärbt	—

Die Ribonuclease wurde in m/15-Phosphatpuffer $p_H = 6$ oder in destilliertem Wasser gelöst. Als vorteilhaft erwies sich ihre Anwendung bei 37° C. Bei jedem Versuch diente ein Kontrollpräparat dem Aktivitätsnachweis des angewandten Fermentes. Zu diesem Zweck wurde es so lange der Pufferlösung ohne Fermentzusatz ausgesetzt wie die normalen Präparate in der gepufferten Enzymlösung blieben. Das Kontrollpräparat erfuhr sonst dieselbe Behandlung wie die den Enzymen ausgesetzten Präparate.

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich wird, eignet sich eine Fermenteinwirkung während 20 min bei 37° C am besten zur Darstellung der DNS

Tabelle 2. *Behandlung der Symbiontenausstriche mit 0,02% iger Ribonuclease*

	30°C 10 min	37°C 10 min	37°C 20 min	45°C 10 min	50°C 10 min	Kontrollpräparat
Symbiontenstruktur	viel zu schwache Färbbarkeit der Struktur	blasse Anfärbung	deutliche Färbung	schlechte Färbung	schlechte Färbung	meist homogen durchgefärbt

Alle Präparate wurden 35 min gefärbt.

bei *Camponotus*-Symbionten. — Die chromatische Substanz (Abb. 2b) wird dann bei anschließender Giemsa-Färbung gut sichtbar. Sie wird jedoch, wie spätere Untersuchungen gezeigt haben, kontrastreicher

dargestellt, wenn Nachverdauung mit Pepsinlösung erfolgt, was auch PETERS und WIGAND (1953) sowie GIESBRECHT (1957) bei Bakterien aus Reinkulturen feststellten.

Der spezifische Nachweis auf DNS-haltige Substanz in den fraglichen Strukturen wurde durch Desoxyribonuclease-Behandlung erbracht, durch welche nach vorangehender Aktivierung des Enzyms mittels $MgSO_4$ die vorher blau gefärbte chromatische Substanz entfärbt wurde.

c) Behandlung mit $HClO_4$ nach CASSEL. Um eventuelle Artefakte, die durch warme salzsaure Hydrolyse entstehen können auszuschließen, wird in diesem

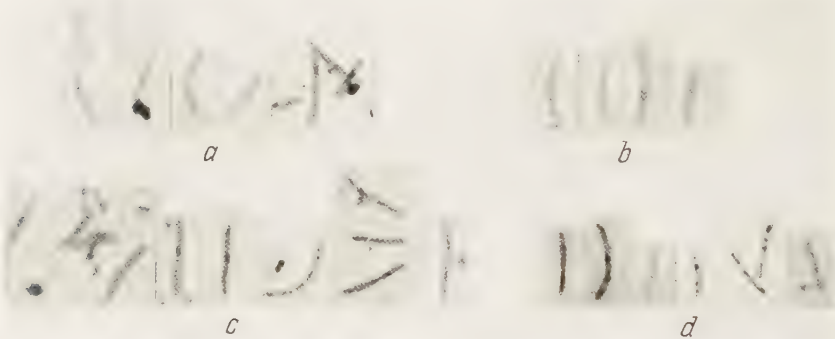


Abb. 2a—d. Symbionten aus Mycetocyten des Mitteldarmepithels bei *Camponotus* (Freilandtiere, im Oktober fixiert). a HCl-Giemsa-Färbung nach PIEKARSKI-ROBINOW. b Ribonuclease-Behandlung und Giemsa-Färbung. c Perchlorsäure-Methode nach CASSEL. d Modifizierte Robinow-Färbung nach MUDD und SMITH. Vergr. etwa 1050 $\times$

Fälle mit 10%iger $n-HClO_4$ bei $4^\circ C$ hydrolysiert, anschließend in fließendem Leitungswasser und destilliertem Wasser ausgewaschen und sodann in 0,1%iger Fuchsinlösung einige Sekunden gefärbt.

Eine Perchlorsäureeinwirkung von 27 Std ergibt eine distinkte Darstellung der Bakterienbinnenstrukturen (vgl. Abb. 2c), welche aber bei 45stündiger Säureeinwirkung wesentlich verblassen. — Alle Perchlorsäurepräparate waren auf die Dauer nicht so haltbar wie z. B. Präparate mit HCl-Vorbehandlung.

d) Um ganz sicherzugehen, habe ich außerdem noch die modifizierte Robinow-Färbung nach MUDD und SMITH verwendet:

Es wird ebenfalls mit OsO_4 -Dämpfen fixiert und nach der HCl-Hydrolyse in 1%igem Formaldehyd 2—4 min gebeizt, danach mit 0,3%iger wäßriger Fuchsinlösung gefärbt, wodurch Strukturen dargestellt werden, wie Abb. 2d sie zeigt.

Vergleicht man die Ergebnisse dieser 4 Färbemethoden (Abb. 2a —d), so fallen in sämtlichen Bildern immer wieder dieselben stark färbbaren Körper in den Bakterien auf. Zweifellos handelt es sich hier um Einschlüsse von Desoxyribonucleinsäure, an deren Natur auf Grund der

vielfältig schon erprobten Färbemethoden und des spezifischen Abbaus durch Desoxyribonuclease kaum mehr gezweifelt werden kann.

Weitere DNS-haltige Substanz findet sich entweder in diffuser Verteilung oder aber mehr oder minder verdichtet bzw. fadenförmig angeordnet, je nach dem Stadium des Symbionten. Alle Nachweismethoden stellen im Prinzip diese Verhältnisse heraus, wenn auch eingeräumt werden muß, daß die einzelnen Methoden sich mitunter in der Intensität der Färbung dieser Strukturen etwas unterscheiden. — Die Perchlorsäuremethode, sowie die Färbung nach MUDD und SMITH tingieren nach meinen Erfahrungen verschiedentlich auch noch andere Substanzen, weshalb bei den weiteren Versuchen in dieser Arbeit hauptsächlich mit der HCl-Giemsa-Färbung und der enzymatischen Methode gearbeitet wird.

Weiter konnten mit dem Farbstoff Nr. 6120/12 der Ciba (GRIEDER, NEIPP und MEIER 1954) in anderen Symbiontenstadien Chromatinstrukturen dargestellt werden¹. — Auch die Feulgensche Nuclealreaktion an Schnitten brachte positive Ergebnisse für die Endosymbionten.

V. Die Symbionten während der Entwicklung des Wirtes

Über die Symbiose bei *Camponotus* berichteten bereits BLOCHMANN (1884, 1887 und 1892), BUCHNER (1918, 1928 und 1953) und HECHT (1924). Diese Autoren untersuchten vorwiegend die Lokalisation der stäbchenförmigen Symbionten während der Embryonalentwicklung des Wirtes mit Hilfe von histologischen Methoden. Das morphologische Verhalten der Symbionten während der Entwicklung des Wirtes sowie ihre Kernverhältnisse blieben noch ungeklärt. Deswegen beschäftigt sich diese Arbeit (an Hand von Ausstrichen) mit der Morphologie und den Kernverhältnissen der symbiontischen Bakterien.

Wir wollen zunächst die Symbionten in den Mycetocyten betrachten und beginnen deshalb mit den Larven.

1. Larven

Die Symbionten verschieden alter Larven wurden untersucht und dazu die Larven je nach ihrer Größe in Eilarven (bis zu 2 mm), Larven mittleren (etwa 4 mm) und älteren Stadiums (bis 6,5 mm) eingeteilt. Das genaue Alter der jeweils überprüften Tiere kann nie angegeben werden, da die Dauer des Larvenstadiums von trophogenen und klimatischen Faktoren abhängig ist. Nachdem aber alle Larven zum gleichen Zeitpunkt aus demselben Nest entnommen wurden, die Außenfaktoren also bestimmt dieselben waren, konnte die altersmäßige Einteilung nach ihrer Größe vorgenommen werden.

¹ Den Farbstoff verdanke ich der freundlichen Unterstützung von Herrn Dr. NEIPP (Ciba-Basel).

Vergleicht man die Symbionten in den Bakteriocyten des Mitteldarmes verschieden alter Entwicklungsstadien der Roßameise, so ergeben sich nicht nur in der Länge und Dicke der Symbionten, sondern vor allem auch hinsichtlich ihrer Binnenstrukturen recht erhebliche Unterschiede.

Bei älteren Larven besiedeln schmale Stäbchen von durchschnittlich 4—11 μ Länge und etwa 0,5 μ Breite die Mycetocyten (Abb. 3a).

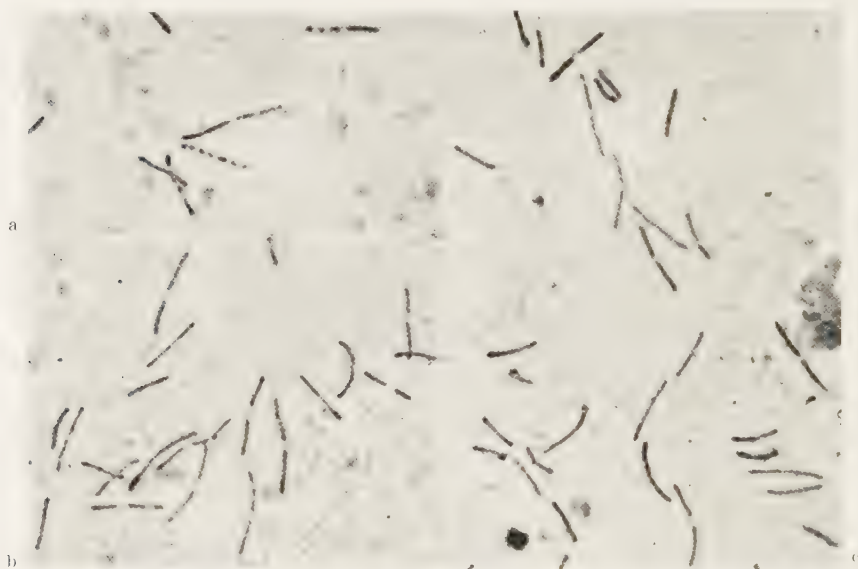


Abb. 3a—c. Symbionten von *Camponotus ligniperda*. a Aus einer älteren Larve; b und c aus einer Larve, die sich bereits im Kokon eingesponnen hatte. Färbung nach PIEKARSKI-ROBINOW. Vergr. etwa 1300 $\times$.

Ihre DNS-positiven Körperchen liegen in einer Reihe regelmäßig hintereinander angeordnet, weshalb diese Struktur im folgenden als *Perlschnurstruktur* bezeichnet wird. Nur in den Larven dieser gleichen Alterskategorie besitzen die Symbionten diese typische Perlschnurstruktur.

Ein etwas anderes Bild bieten die Symbionten solcher Larven, die sich bereits in einem Kokon eingesponnen haben (Pronymphen). Viele Teilungsformen der Bakterien weisen auf einen ersten Vermehrungsschub der Symbionten zu Beginn der Vorpuppenperiode hin. — Diese Teilungstendenz der symbiontischen Mikroorganismen wirkt sich auch in ganz charakteristischen cytologischen Veränderungen aus. Die Symbionten enthalten nicht mehr jene Perlenreihen von Chromatinkörperchen, wie sie noch in älteren Larven auftreten (Abb. 4a). Vielmehr macht sich in ihrem Innern eine Tendenz des Auseinanderrückens der

Chromatinkörnchen nach beiden Polen zu bemerkbar. So entsteht in der Mitte des Bakterienleibes eine chromatinfreie Zone (Abb. 3b und 4b), in welcher später sich dann der Symbiont in 3—5 μ lange Teilungsprodukte durchschnürt. — Zu dieser Zeit können sich die Symbionten unterschiedlich verhalten. Die einen teilen sich, wobei die chromatische Struktur beibehalten, jedoch enger im Symbionten gelagert wird (Abb. 3c). Bei den anderen verbreitern sich die Chromatinelemente (Abb. 4c) und bilden oft quergelagerte Balken. Deshalb wird diese Struktur im folgenden als *Querbalkenstruktur* bezeichnet. — Verschiedentlich nehmen einzelne dieser Querbalken gehackelte Gestalt an. — In beiden Fällen entstehen also Teilungsprodukte, welche die chromatische Substanz in dichter Lagerung verteilt enthalten.

Diese kleineren Formen lagern sich im Ausstrich verschiedentlich so, daß ungefähr gleich lange und morphologisch gleiche Stäbchen parallel, oft im Abstand von 1 μ oder in einem spitzen Winkel zu liegen kommen (Abb. 3c). Sie berühren sich vielfach in einem Punkt oder liegen teilweise so nahe beisammen, daß eine Gabel entsteht. Vielfach ist auch die eine Hälfte beider Komponenten verschmolzen, während die andere in ganz

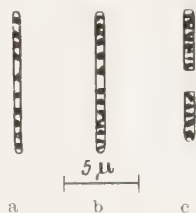


Abb. 4a—c. Symbionten von *Camponotus ligniperda*. a Perlenreihen von Chromatinkörnchen, wie sie in Symbionten aus älteren Larven auftreten; b und c Symbionten aus Pronymphen. (Erklärung im Text)

schmale Stücke gegabelt ist. — Die einzelnen Partner können spiralg umeinander geschlungen sein, so daß Bilder entstehen, ähnlich wie sie LEINER, WOHLFEIL und SCHMIDT (1951 — Abb. 5, S. 160) bei Symbionten von *Pelomyxa* darstellen. Diese Autoren versuchen nachzuweisen, daß die Symbionten von *Pelomyxa* „sich paaren“ und Gonidien bilden. — Doch lassen alle weiteren Untersuchungen an *Camponotus*-Symbionten darauf schließen, daß keine „chemotaktische“ Anziehung der Spaltprodukte erfolgt, lassen doch die Mikroorganismen der darauffolgenden Entwicklungsstadien des Wirtes weder Gonidienbildung noch als Zygoten anzusprechende Formen erkennen. Zwar tauchen im Laufe der Entwicklung Stadien auf, die jenen Formen in dem „Sexualprozeß“ bei sternbildenden Bakterien (HEUMANN 1956) sehr ähneln, jedoch war bei den Symbionten von *Camponotus* ein solcher nie zu beobachten. Es wäre auch erstaunlich, sollten gerade diese dicht in die Mycetocyte gepackten Symbionten zur Kopulation schreiten, nachdem man diesen Vorgang bei anderen Bakterien nur bei einem so großen Überschuß von Nährsubstrat erreichte, so daß sogar der „hängende Tropfen“ nicht genügend Raum bot, um Sternbildung zu ermöglichen (STAPP und KNÖSEL 1956). Sie erklärten: „Sicherlich spielt hierbei die hemmende Wirkung der Stoffwechselprodukte eine Rolle, die sich auf Grund fehlen-

der Diffusionsmöglichkeiten schnell anreichern und nachteilig geltend machen.“

Nun gibt es aber auch pathogene Bakterien, für die paariges Wachstum geradezu charakteristisch ist; hierher gehören z. B. Gonokokken, Meningokokken, Pneumokokken und Rauschbrandbazillen. Doch lassen weitere Ausstriche von anderen Wirtsstadien darauf schließen, daß paariges Wachstum bei diesen Symbionten nicht zutrifft.

Man könnte hier mit Recht einwenden, daß die stäbchenförmigen Symbionten von *Camponotus* in den Mycetocyten meist parallel aufgerollt und gebündelt liegen (BUCHNER 1953 — Abb. 276, S. 460) und deswegen auch in den Ausstrichen parallele Orientierungen zustande kommen könnten. — Demgegenüber muß jedoch die Tatsache berücksichtigt werden, daß bei *Camponotus* diese orientierte Symbiontenlagerung in den Mycetocyten des Mitteldarmepithels während der ganzen Entwicklung des Wirtes (mit Ausnahme bei der Degeneration) auftritt. Nur aber in den Pronymphen zeigen die Symbionten in den Ausstrichen diese beschriebenen Lagebeziehungen. — Die Häufigkeit, mit welcher solche Lagerungen in dieser Vorpuppenphase auftreten, spricht auch gegen die Auffassung, daß es sich dabei um Kunstprodukte handeln könnte. Es bleibt nur die Möglichkeit, daß die Symbionten bei der Teilung an der Plasmabrücke umknicken, also eine „Knickungsteilung“ vorliegt, wie sie von Tuberkel- und Diphtheriekeimen bekannt ist.

Der erwähnte Vermehrungsstoß der Symbionten, welcher in der Pronymphe beginnt, stellt sozusagen den Übergang zu den Verhältnissen der Symbionten des Puppenstadiums dar.

2. Puppen

Die Puppen wurden eingeteilt in junge, mittlere und ältere Stadien und von jedem mehrere Ausstriche und Schnitte angefertigt. Als jung wurden solche Tiere bezeichnet, die noch völlig weiß waren, während mittlere Stadien bereits braune Augen und ein gelbes Abdomen aufwiesen. Ältere Puppen hatten Augen und Abdomen bereits braun, dagegen den Kopf hellbraun gefärbt. — Der Mitteldarm ist bei allen Puppenstadien kugelig und so klein, daß für einen Ausstrich der ganze Mitteldarm verwendet werden konnte. Dadurch war es möglich, alle in der entsprechenden Puppe vorkommenden Symbiontenformen im Ausstrich zu erfassen.

Während der 3 Puppenstadien trifft man eine Vielfalt von Symbionten an, die immer ausgeprägter hervortritt, je älter die einzelnen Puppen werden.

In der *jungen* Puppe fallen zunächst viele kleine, stark tingierte, 2,5–5 μ lange Stäbchen auf, die durch Querteilung ebenfalls stark

gefärbter Bakterien entstanden sind. Zahlreiche Teilungsstadien und eine stärkere Zunahme der kurzen Mikroorganismen weisen auf eine rege Vermehrung in dieser Phase hin.

Daneben liegen in solchen Ausstrichen Symbionten in den verschiedensten Größen. Vielfach begegnen wir breiteren Formen, deren chromatische Substanz in Gestalt und Größe sehr unregelmäßig ausgebildet ist. Die einzelnen Chromatinpartikelchen sind durchschnittlich kleiner als in den Symbionten älterer Larven (vgl. z. B. Abb. 6a mit Abb. 3a). — An anderen Stellen des Ausstriches findet man Symbionten, deren Chromatinkörperchen regelmäßig in parallel zueinander verlaufenden Reihen angeordnet sind. Dieselben werden in der Folge als *Parallelform* bezeichnet (Abb. 5b α und 6a α). — Dabei sind wieder zwei verschiedene Typen zu unterscheiden: solche Formen, bei denen die chromatischen Körperchen zu Paaren geordnet hintereinanderliegen (Abb. 5b α und 5c α), und andere wiederum, bei denen keine solche Regelmäßigkeit in den nebeneinanderliegenden Körnchenreihen zu notieren ist (Abb. 5a β). Beide Typen treten vorerst in den 3 Puppenstadien nur zu einem sehr geringen Prozentsatz auf.

Häufig sind dagegen solche Mikroorganismen, in denen jene parallel gelagerten Körperchen mit queren Balken, die teils senkrecht, teils schräg zur Längsachse verlaufen, abwechseln (Abb. 5a β , 5d β , 6a β und 6b β). Bei manchen Formen hat man dabei den Eindruck einer netzartigen Struktur der Chromatinkomponenten (Abb. 5d γ). Solche ähnliche Querbalken hat ROBINOW bei *Esch. coli* (aus Dubos 1949) als "dumbbell-shaped chromosomes" beschrieben; jedoch ist ihre Anordnung bei diesem Objekt anders als bei den *Camponotus*-Symbionten.

Gelegentlich ändert sich das Bild einer regelmäßigen Verteilung der chromatischen Substanz insofern, als Chromatinpartikel etwas weiter auseinanderzurücken, teils in der Längsrichtung, teils aber auch an die Peripherie des Symbionten (Abb. 5b β und 5a γ).

Man hat dabei den Eindruck, daß es sich um eine passive Verschiebung der Chromatinkomponenten durch Einlagerungen von Substanzen handelt, die bei schmäleren Symbionten, deren Chromatin meist in einer Reihe größerer Granula ausgebildet ist (Abb. 5b γ und 5d α), mitunter zu partiellen kleinen Auftreibungen der Symbionten führen können (Abb. 5d δ , 5c δ und 6a δ).

Über die Natur der Einschlüsse vermag ich keine Aussagen zu machen, wahrscheinlich handelt es sich um Reservestoffe, die gestapelt werden.

Schon DELAPORTE (1950) erkannte, daß die chromatische Substanz bei *Bacillus B* (Plate I Abb. 25) und anderen Mikroorganismen durch verschiedene Einschlüsse verlagert wird und schreibt: "When reserve

substances (lipids, glycogen a.s.o.) are found in the central part of the cell, they push against the nuclear element and deform it, and can also fragment it into several parts, . . .”

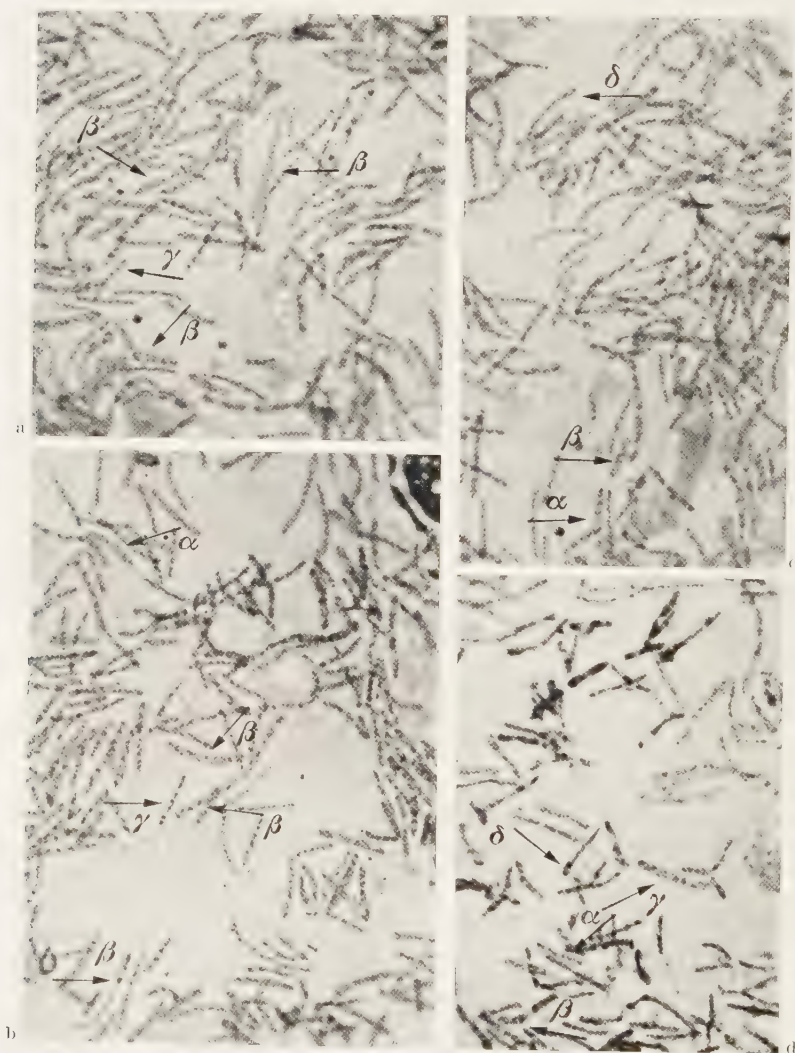


Abb. 5a—d. Symbionten aus jungen Arbeiterinnenpuppen von *Camponotus ligniperda*. HCl-Giemsa-Färbung nach PIEKARSKI-ROBINOW. Vergr. etwa 1300 $\times$. (Erklärung im Text)

In der *mittleren* Puppe fällt die Zunahme der kleineren, stark tingierten Stäbchen, die manchmal eine lichtbrechende ovale Stelle aufweisen, besonders auf neben den größeren, breiteren Mikroorganismen mit den deutlichen Binnenstrukturen (Abb. 6b).

In der *älteren* Puppe prägen sich die Größendifferenzen der Symbionten immer mehr aus. Besonders in jenen Mitteldarmpartien, welche den heranwachsenden Ovariolen dicht anliegen, treten vorwiegend die

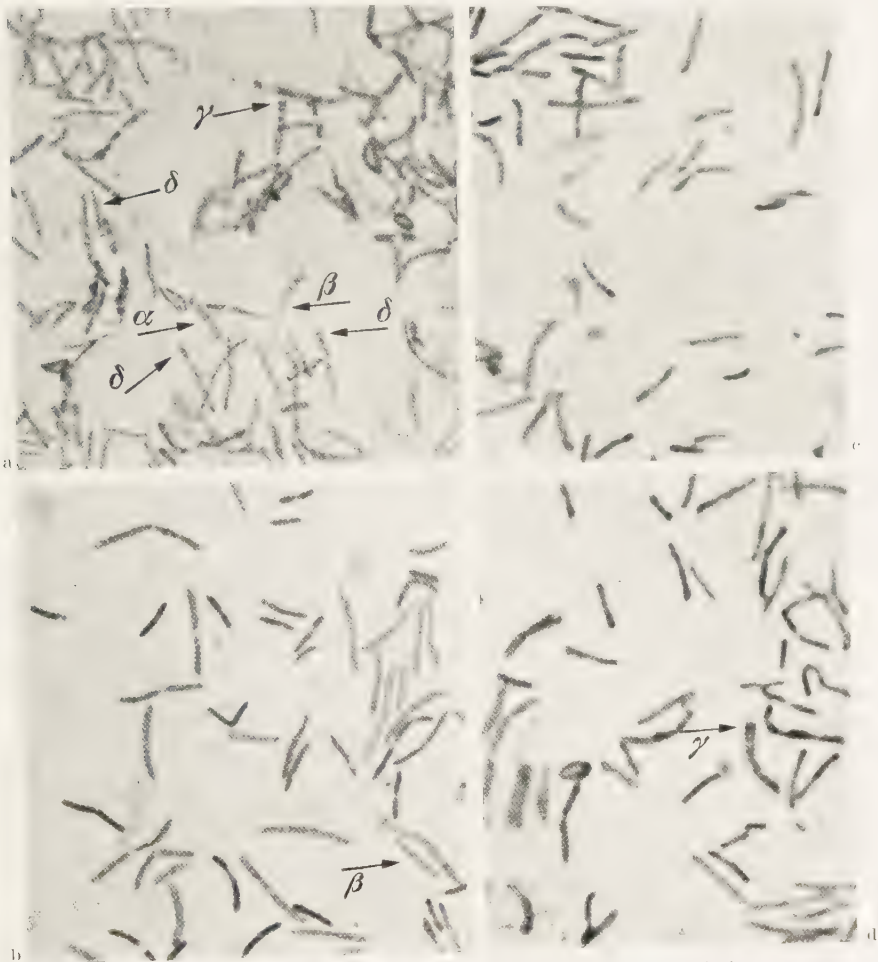


Abb. 6a — d. Symbionten aus den Mycetocyten des Mitteldarms von Arbeiterinnenpuppen.
a Aus junger Puppe (Vergr. etwa 1300 $\times$); b aus mittlerem Puppenstadium (Vergr. etwa 1400 $\times$); c und d aus älterer Puppe mit bereits braunem Abdomen. Vergr. etwa 1500 $\times$.
Färbung nach PIEKARSKI-ROBINOW

stark gefärbten Kleinformen auf (Abb. 6c und d), wie das später, wenn von der Ovarialinfektion die Rede ist, noch genauer geschildert werden soll.

An anderen Stellen des Mitteldarmes befinden sich zu dieser Zeit jene breiteren und größeren Symbiontenformen, wie wir sie schon in

der jungen Puppe kennengelernt haben; nur sind jetzt die Chromatinkörperchen lockerer gepackt.

Da und dort zeigen sich Andeutungen einer Gabelung (Abb. 6a γ in Symbionten einer jungen Puppe und Abb. 6d γ in Symbionten einer alten Puppe), woraus man auf eine beginnende Längsspaltung oder Verzweigung schließen könnte. Daneben kommen schmale Symbiontenformen mit Perlschnurstruktur vor, über deren Entstehung keine Beobachtungen vorliegen. — Über die Genologie dieser Formen lassen sich nur an Hand von Reinkulturen sichere Schlüsse ziehen.

Längsteilungen wurden zwar von BRAULKE (1933) an Vibrionen und von SCHMIDT (1933) an Stäbchen beobachtet, die unter LiCl-Einfluß aus Sarcinen herausgezüchtet wurden. — Doch sind diese Angaben mit Vorsicht aufzunehmen. Es scheint bei den *Camponotus*-Symbionten eine Längsspaltung recht unwahrscheinlich zu sein, wenn auch manche Bilder zu solch einer Annahme verleiten.

Häufiger als in der jungen Puppe sind in diesem Stadium des Wirtes mittelgroße (etwa 4—10 μ) Stäbchen zu finden, welche die erwähnte Struktur einer Perlschnur besitzen, aber distal oder nahe am Ende eine Verdickung aufweisen. Sie ähneln morphologisch schon etwas den „Löffel- oder Tennisschlägerformen“, die auf S. 25 Abb. 8c beschrieben werden.

Im Vergleich zu den übrigen Entwicklungsstadien von *Camponotus* ist bei den Puppen eine bunte Vielfalt nebeneinander vorkommender Symbiontenstadien zu beobachten.

Der bereits erwähnte Vermehrungsschub der kleineren Stäbchen, der in der Pronymphenonsetzt und in der mittleren und älteren Puppe seinen Höhepunkt erreicht, erinnert uns an ähnliche Prozesse bei anderen Symbiosen. — Bei *Formica fusca* z. B. erwähnt LILIENSTERN (1932) eine starke Vermehrung der Symbionten im älteren Puppenstadium. Weiterhin wurde eine Symbiontenvermehrung während der Puppenruhe bei *Lyctus linearis* GOEZE beobachtet (KOCH 1936).

Wir verstehen jetzt auch, daß zur Zeit der Puppenruhe von *Camponotus* der Entwicklungszustand der Symbionten in den Mycetocyten diesem Vermehrungsschub entsprechend recht verschieden sein kann. In der Jungimago¹ müssen wir daher erwartungsgemäß auf verschiedene Symbiontenformen nebeneinander in den Mycetocyten stoßen.

3. Jungimagines

In den Jungimagines in einem Alter bis zu 2 Tagen konnte ich keine auffälligen Veränderungen in den Symbionten beobachten. (Es war also nicht notwendig, eine weitere Einteilung dieser Jungtiere nach dem

¹ In den folgenden Abschnitten werden Arbeiterinnen und Soldaten als „Imagines“ gemeinsam behandelt, da sich ihre Symbionten in allen Fällen gleich verhalten.

Ausfärbungsgrad des Kopfes vorzunehmen.) Deshalb werden im folgenden alle frisch geschlüpften Imagines bis zu einem Alter von 2 Tagen als *Jungimagine*s bezeichnet.

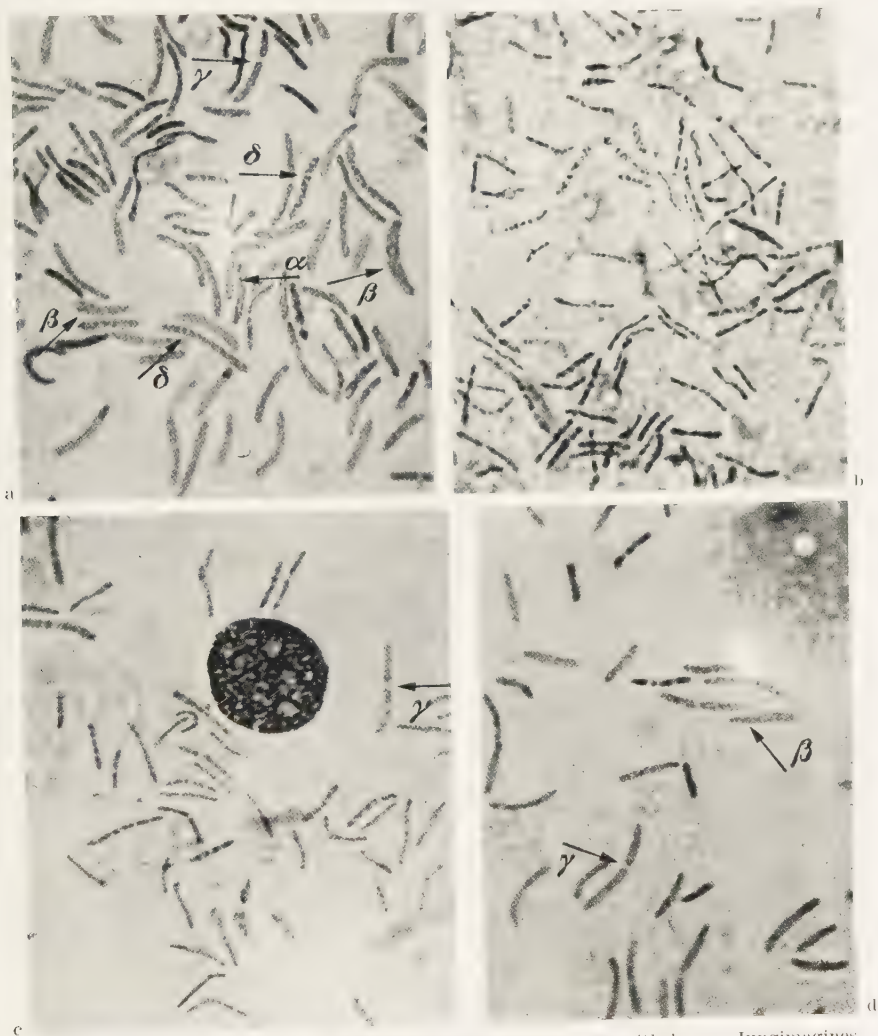


Abb. 7a—d. Symbionten aus den Mycetocyten des Mitteldarmepithels von Jungimagine (Arbeiterinnen). HCl-Giemsa-Färbung nach PIEKARSKI-ROBINOW. Vergr. etwa 1300 $\times$

In der Jungimago trifft man mehrere Symbiontenformen mit verschieden ausgebildeten Binnenstrukturen an. Nunmehr dominieren die Parallelförmigen, und die paarige Anordnung der einzelnen Chromatinelemente ist jetzt wesentlich klarer als in den Symbionten der Puppe (Abb. 7a α und 8a α). — In den meisten Fällen erscheinen jedoch die

zweireihig angeordneten Chromatinpartikelchen unregelmäßig verteilt (Abb. 7a β und 7d β). Bei einigen Formen weisen mediane Einschnürungen des Protoplasten auf bevorstehende Querteilungsprozesse hin (Abb. 7a γ , 7c γ , 7d γ und 8d γ). — Doch finden sich daneben auch solche Formen, deren eines Ende stark verbreitert ist und in welchem die beiden Körnchenreihen stark divergieren (Abb. 8a β). Ich möchte jedoch die Frage einer Längsspaltung, auf die man aus solchen Bildern schließen könnte, noch offenlassen. Es könnten auch andere Faktoren, wie polare Einlagerungen von Stoffwechselprodukten, für solche Bilder verantwortlich zu machen sein.

Sehr zahlreich sind außerdem hantelförmige Querbalken (Abb. 7a δ und 8a γ). Alle diese breiteren Symbionten verhalten sich nicht so formkonstant wie die Perlschnurformen (Abb. 7b) und zeigen häufig etwas keulig verdickte Enden (Abb. 8a δ).

Jene stark gefärbten aus dem Puppenstadium bekannten Infektionsformen trifft man in der Jungimago nur noch selten an. Hier treten Mikroorganismen auf, die bei starker Durchleuchtung nicht mehr homogen erscheinen, sondern die perlschnurförmige Struktur in sehr dichter Packung gerade noch erkennen lassen. Manchmal zeigen sie einen kleinen lichtbrechenden Einschluß (Abb. 8a ϵ).

Bei einigen Imagines treten schließlich die den „Löffel- oder Tennisschlägerformen“ gleichenden Stadien auf (Abb. 8b und c), ähnlich jenen, wie man sie bei *Clostridium tetani* vorfindet. Doch handelt es sich bei diesen Symbiontenformen wohl nicht um Sporenbildungsstadien¹ (s. S. 11). Es sind kleine bis mittelgroße Stäbchen, welche einen stielförmigen Abschnitt mit Perlschnurstruktur aufweisen, der nahe am Ende oder terminal verdickt ist (Abb. 8c α). Diese endständigen Verdickungen sind bei einem Teil der Formen nur noch durch einen chromatinfreien Abschnitt mit dem Stiel verbunden (Abb. 8c β), bei anderen dagegen schon etwas vom Stiel getrennt (Abb. 8c γ). Man darf wohl daraus schließen, daß die zu diesem Zeitpunkt sehr häufig auftretenden kugelig-ovalen Körperchen im Ausstrich solche Abschnürungsprodukte sind. — Die Binnenstrukturen in den dazwischenliegenden Stäbchen werden um diese Zeit wieder undeutlich (was vielleicht mit einer zeitweiligen Verarmung an DNS zusammenhängen könnte).

In all diesen Präparaten jedoch sind Parallelförmigkeiten anzutreffen, die wohl in dieser ausgeprägten Form als ein Charakteristikum der Symbionten in Jungimagines betrachtet werden können.

Für die Untersuchungen der Symbionten während der Entwicklung des Wirtes ist von Bedeutung, daß die Ausstriche der Larven, Puppen

¹ Die Sporenfärbung nach MÖLLER und RAKETTE konnte damals nicht durchgeführt werden, doch fiel sie bei ähnlich aussehenden Gebilden älterer Wirtsstadien negativ aus.

und Jungimagines alle aus Tieren desselben Nestes stammen, den gleichen klimatischen Verhältnissen ausgesetzt waren und innerhalb von 5 Tagen präpariert und fixiert wurden. Die Untersuchungen erfolgten

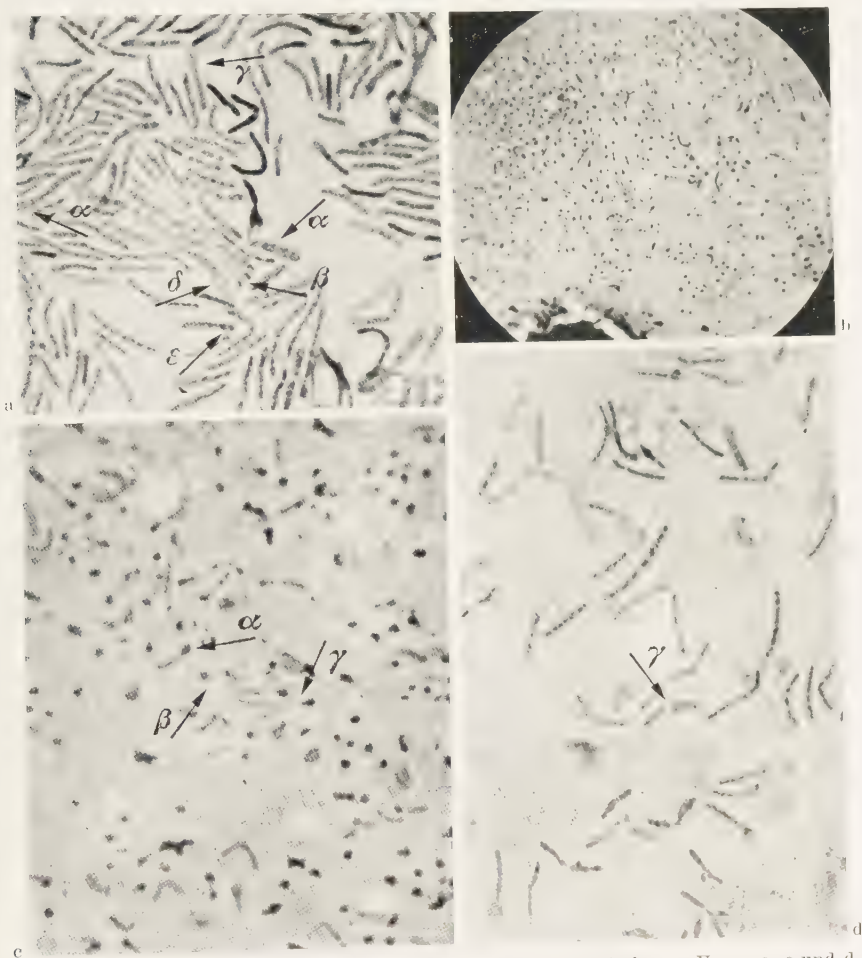


Abb. 8a—d. Symbionten aus jungen Imagines. HCl-Giemsa-Färbung. Vergr. a, c und d etwa 1300 $\times$; b etwa 400 $\times$

also in einer so kurzen Zeit, daß keine Veränderungen der Mikroorganismen durch Wechsel der Umwelteinflüsse auf den Wirt zu berücksichtigen gewesen wären. Vergleichende Versuche von ständig frisch eingeholten Ameisen eines Naturnestes mit Arbeiterinnen und Soldaten desselben Nestes, die aber im Gipsnest weitergezüchtet wurden, ergeben, daß sich die Symbionten dieser Tiere im künstlichen Nest während 6 Wochen

nicht verändern. Versuche über noch längere Zeitspannen hinaus konnten jedoch nicht durchgeführt werden, da dann wahrscheinlich auch andere als jene gleichaltrigen Arbeiterinnen und Soldaten im Gipsnest den Außendienst übernehmen.

Für alle weiteren Versuche mit genau datierten Imagines wurden die Arbeiterinnen und Soldaten direkt nach dem Schlüpfen in die verschiedenen Gipsnester zu älteren Tieren umgesetzt. Letztere waren gut von den Jungtieren durch den dunkleren Thorax zu unterscheiden, der bei den jungen Imagines im Gipsnest erst nach etwa 7 Monaten nachdunkelte. — Diese Tiere waren dann der Zimmertemperatur und anderen Umwelteinflüssen als in freier Natur ausgesetzt. Solche Faktoren wirken sich zweifellos auf die Symbionten aus. Doch war ich, um genau datiertes Material zur Verfügung zu haben, auf die Haltung der Tiere in Gipsnestern angewiesen.

4. Vierwöchige Imagines

In 4 Wochen alten Imagines trifft man Symbionten mit Parallelstruktur (Abb. 9c α) nur noch sehr selten an. Die DNS-haltige Substanz bildet häufig eng gelagerte, teils dünne, teils kräftigere Querbalken (Abb. 9a β und 9c β), welche oft gehantelt und schräg oder quer zur Längsachse orientiert sind (Abb. 9a γ , 9b γ und 9c γ). In seltenen Ausnahmefällen (s. Abb. 9c β) hat man den Eindruck einer Spiralstruktur der chromatischen Substanz. Verschiedentlich sind diese Querstrukturen halbmondförmig gekrümmt (Abb. 9b β). — Neben Symbionten mit vielen eng aufgereihten chromatischen Strukturen findet man auch solche, in welchen die einzelnen Querbalken etwas lockerer angeordnet sind. Häufiger sind jetzt auch rund-elliptische Vakuolen zu erkennen, welche vielfach die ganze Breite der Symbionten einnehmen und an den verschiedensten Stellen, mitunter auch terminal, auftreten (Abb. 9b δ und 9c δ). Werden sie größer, dann erscheint der Symbiont an dieser Stelle verdickt.

Zwischen den eben geschilderten typischen Symbiontenformen treten zu dieser Zeit merkwürdige polymorphe Gebilde auf, die einen Durchmesser von 3–4 μ haben (Abb. 9a–c).

In der Folge möchte ich sie in Anlehnung an v. PRITTWITZ (1953), die solche Gebilde bei *Proteus vulgaris* beobachtet hatte, als „Umwandlungsformen“ bezeichnen. Abb. 9a α zeigt einen solchen Symbionten mit einer endständigen, kleinen Auftreibung. Man darf wohl annehmen, daß diese „Umwandlungsformen“ sich über ein solches Stadium aus den breiteren, stäbchenförmigen Symbionten herausentwickeln. — Weiterhin finden sich alle Übergänge zwischen mehr langgestreckten (Abb. 9b α) bis zu annähernd rundlich ovalen Gebilden (Abb. 9a δ). Sie sind reich

vakuolisiert und die chromatische Substanz ist gewöhnlich in verschieden großen Brocken auf die Randzonen abgedrängt (Abb. 9a δ , 9b ε und

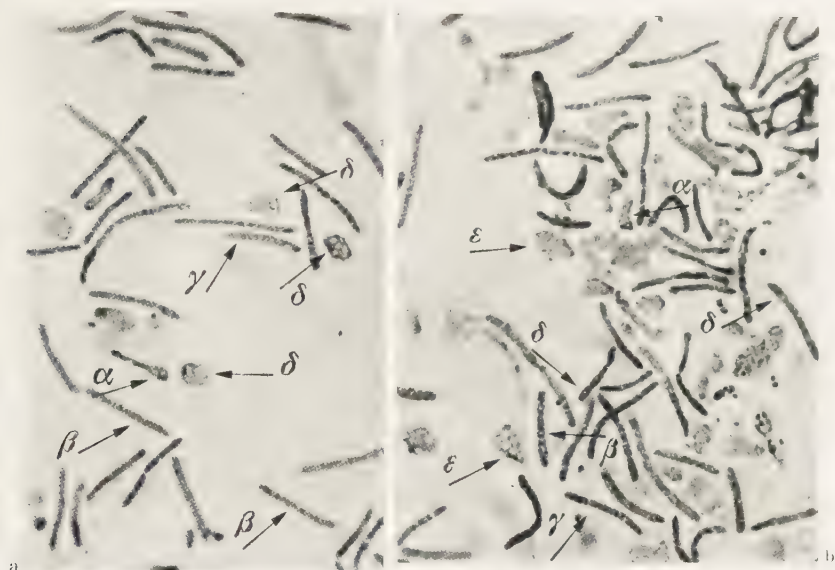


Abb. 9a—c. Symbionten aus 4 Wochen alten Imagines.
HCl-Giemsa-Färbung nach PIEKARSKI-ROBINOW.
Vergr. etwa 1300 $\times$

9c ε). Bei einem Teil dieser bizarren Symbiontenformen jedoch füllt die chromatische Substanz den Raum zwischen den Vakuolen der Randzone aus (Abb. 10a α). — Eine gut sichtbare Begrenzung der „Umwandlungsformen“ ist nicht überall zu beobachten. Bei den birnenförmigen Symbionten von Abb. 9b ε z. B. hat bereits peripher eine Lysis eingesetzt, welche wohl Symbiontenzustände verursacht, wie wir sie in Abb. 10b α und schließlich 10b β vorfinden. — Der

Ausstrich, welcher der Abb. 10b zugrunde liegt, bietet ein völlig anderes Bild, obwohl er einem gleichaltrigen Tier entstammt. Im Interesse einer klaren Darstellung möchte ich erst später auf diese

Symbiontenzustände genauer eingehen, wenn von den Symbionten der Swöchigen Imagines die Rede ist.

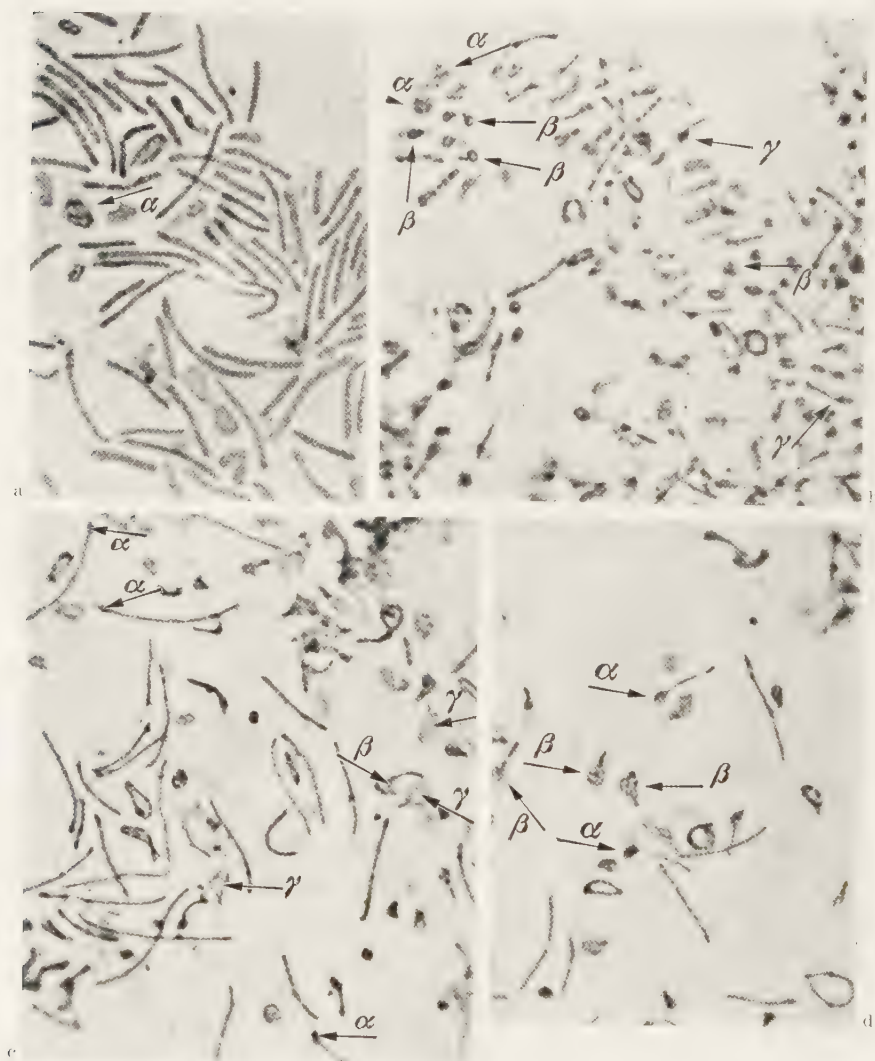


Abb. 10a—d. Symbionten aus den Mycetocyten des Mitteldarmepithels. a und b aus 4 Wochen alten Imagines; c und d aus 8 Wochen alten Imagines. HCl-Giemsa-Färbung nach PIEKARSKI-ROBINOW. Vergr. etwa 1300 ×

Solche Gestaltsveränderungen, wie wir sie bei den „Umwandlungsformen“ gesehen haben, sind uns von den verschiedensten nicht symbiontischen Bakterien schon längere Zeit bekannt und wurden zuerst bei alternden Kulturen beobachtet.

FLEMING u. Mitarb. (1950) und v. PRITTWITZ (1953) fanden solche bizarre, vakuolisierte Gebilde bei *Proteus vulgaris* nach Penicillineinfluß. — Der Verlauf, den der Formwandel der *Camponotus*-Symbionten nimmt, überrascht uns keineswegs, wenn wir ihn mit jenem der Kugelformen von *Proteus vulgaris* vergleichen, die unter Penicillineinfluß standen. So schreibt v. PRITTWITZ (1953): „Im Verlaufe weiterer Beobachtungen löste sich die anfänglich scharfe Begrenzung der Kugelformen auf, und die Granula lagen in losem Verband auf dem Agar.“

Neuerdings hat auch BENDER (1957) beim gleichen Objekt in Serienaufnahmen den gleitenden Übergang von einer Form in die andere festgehalten (s. BENDER, Abb. 1a—l). Auch die lytischen Erscheinungen hat BENDER stufenweise bei *Proteus vulgaris* beobachtet.

Es kann sich bei den Umwandlungsformen von *Camponotus*-Symbionten bestimmt nicht um Artefakte handeln, die auf Quellungserscheinungen zurückzuführen sind, da nachweislich das untersuchte Material nur kurze Zeit (4 min) dem Präparationsmedium ausgesetzt war und nach meiner Beobachtung ein Aufquellen der Symbionten in diesem Medium frühestens nach 25 min beginnt. Zudem sind die flächigen Formen geradezu typisch für die Symbionten dieses Altersstadiums von *Camponotus*. — Die Vermutung liegt also nahe, daß sich der physiologische Zustand der Symbionten in der Mycetocyte durch Einwirkung äußerer Faktoren geändert hat. Ein solcher Formwandel der Symbionten unter dem Einfluß des Wirtsorganismus ist ja bei sehr vielen Insektensymbiosen beobachtet worden.

5. Achtwöchige Imagines

Bei den Symbionten 8wöchiger Imagines dominieren fädige, durchschnittlich $14\ \mu$ lange Mikroorganismen (Abb. 10c, d und 11a) mit mehr oder weniger deutlicher Perlschnurstruktur. Daneben treten zu diesem Zeitpunkt zum erstenmal während der Entwicklung des Wirtes auch einige wenige verzweigte Formen auf.

Vielfach besitzen die fädigen Symbionten an einem Ende eine stark färbbare Auftreibung (Abb. 10c α), welche in der Regel mit dem Grad der Verkürzung der Fäden an Dicke zunimmt (Abb. 10d α und 11a α). — Hier stellen wir bereits eine große Ähnlichkeit fest mit jenen Symbionten, wie ich sie in Ausnahmefällen schon bei 4wöchigen Imagines vorfand (Abb. 10b γ). In den Symbionten beider Altersstadien des Wirtes (in 4- und 8wöchigen Imagines) enthalten diese kleineren, glasigen Verdickungen chromatische Substanz und verschieden große Vakuolen. Doch finden sich neben diesen Symbionten mit kleinen, terminalen Verdickungen auch kürzere Formen, die bereits bulbosartige Auftreibungen besitzen (Abb. 10d β). Sie enthalten mehrere kleine Vakuolen in dem stark verbreiterten Abschnitt. Vergleichen wir Symbiontenformen, wie sie in Abb. 10d β , 10c β und 10c γ wiedergegeben sind,

miteinander, so fällt uns auf, daß die Länge des fädigen Abschnittes mit der Entfaltung der bulbosartigen Auftreibung abnimmt. In Abb. 10c β ist an die Stelle von mehreren kleinen Vakuolen eine große Vakuole getreten, um welche peripher die chromatische Substanz gelagert ist.

Betrachten wir nun Abb. 10c γ (aus einer 8wöchigen Imago) und Abb. 10a α (aus einer 4wöchigen Imago), so fällt eine große Ähnlichkeit beider Symbiontenformen auf. Die Annahme, daß Abb. 10c γ ein etwas weiter fortgeschrittenes Stadium der „Umwandlungsform“ der *Camponotus*-Symbionten darstellt, besteht wohl zu recht. Der kleine Stiel, der dem ganzen eine birnenartige Gestalt verleiht, zeigt dann nach meiner Auffassung den Beginn einer Weiterentwicklung zur ursprünglichen Fadenform an.

Verschiedene Symbiontenzustände des Ausstriches der Abb. 10b führen uns zu der Annahme, daß die fädigen Symbionten auch auf eine etwas andere Art aus den „Umwandlungsformen“ entstehen können. — Die vielen kleinen, an einem Pole rund, am entgegengesetzten etwas spitz erscheinenden Gebilde (Abb. 10b β) aus der 4wöchigen Imago sind den danebenliegenden bizarren, stark tingierten und vakuolisierten (Abb. 10b α) sehr ähnlich. Abb. 10b α läßt eine Lysis des umgebenden Plasmas erkennen, so daß man wohl berechtigt ist, zu folgern, diese kleinen rund-ovalen Gebilde seien durch Zusammenfließen der chromatischen Substanz der „Umwandlungsformen“ gebildet worden.

Wenn auch die Annahme etwas gewagt erscheint, daß die Symbiontenzustände, wie sie in Abb. 10b α dargestellt sind, durch lytische Prozesse aus den „Umwandlungsformen“ der Abb. 10a α entstanden sind, so bestärken mich neuere Untersuchungen an *Proteus vulgaris* von BENDER (1957) und v. PRITTWITZ (1953) in dieser Auffassung.

v. PRITTWITZ (1953) fand bei Phasenkontrastbeobachtungen, daß die „Umwandlungsformen“ von *Proteus vulgaris* einer Lysis unterliegen und „Granulationsformen“ übrigbleiben. „Eine Rückwandlung der Granulationsformen zu normalen Stäbchen ist nach Übertragung auf penicillinfreien Nährboden unter bestimmten Umständen möglich.“ Mittels der Feulgenschen Nuclealreaktion beobachtete sie, daß die „Kugelformen mit einer Menge von Nucleoiden wechselnder Größe in verschiedener Anordnung erfüllt waren. Häufig traten besonders im Beginn der Teilungshemmung große, klumpige oder stabförmige Kernäquivalente auf.“

BENDER (1957) hat in vivo diese lytischen Prozesse verfolgen können (s. BENDER 1957, Abb. 1h—l).

Es ist also möglich, daß auch bei den *Camponotus*-Symbionten ein ähnlicher, auf den ersten Blick vielleicht schwer verständlicher Umwandlungsprozeß stattfindet. Abb. 10b γ und 11a α könnten als Beleg dafür

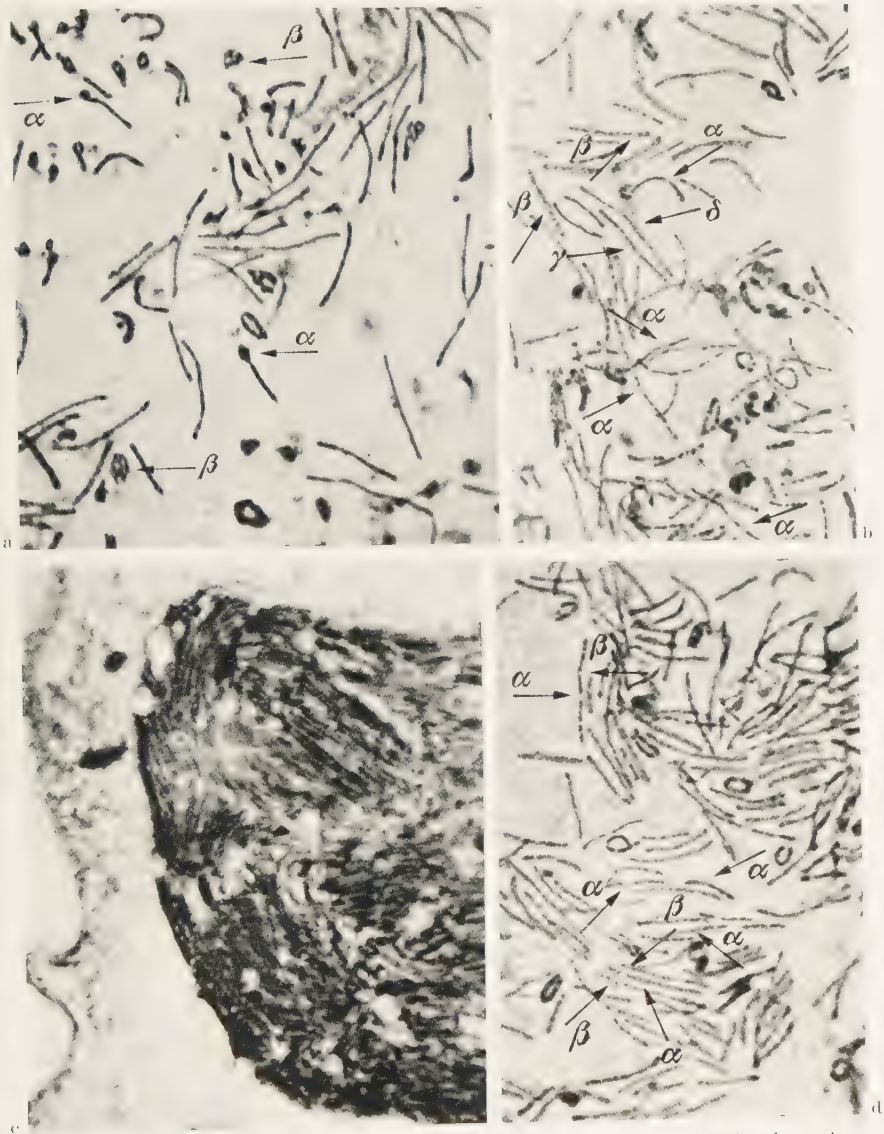


Abb. 11a—d. Symbionten aus dem Mitteldarmepithel von *Camponotus ligniperda*. a Aus 8wöchiger Imago; b und d aus 18wöchigen Imagines. Färbung nach PIEKARSKI-ROBINOW. Vergr. etwa 1300 $\times$. c Anschnitt einer Mycetocyte im Mitteldarm einer 18 Wochen alten Imago. Färbung nach HEIDENHAIN. Vergr. etwa 900 $\times$

gelten. Dieser Umwandlungsprozeß kann sich auch über einen längeren Zeitraum hin erstrecken. Auch bei den 8wöchigen Imagines lassen sich noch vereinzelt solche „Umwandlungsformen“ finden (Abb. 10c β und 11a β).

Die Tatsache allein, daß in den Symbiontenausstrichen der 4wöchigen Imagines breitere Fäden und „Umwandlungsformen“, bei 8wöchigen Imagines dagegen dünnere, fädige Symbionten vorherrschen, weist auf die Möglichkeit hin, daß die schlanken, fädigen Symbionten aus den breiteren Stäbchen und bizarren Gebilden hervorgegangen sind. — Den endgültigen Beweis dafür könnte nur eine Beobachtung in vivo an Reinkulturen der *Camponotus*-Symbionten erbringen.

Selbst in 12 Wochen alten Imagines, welche vor Eintritt des Winterschlafs untersucht wurden, findet man noch jene Symbiontenformen und -strukturen vor, wie sie in Abb. 10a—d dargestellt sind.

6. Imagines im Winterschlaf

Die im Januar untersuchten 18wöchigen Imagines befanden sich in festem Winterschlaf. — Dieses Stadium des Wirtes zeigt also Mikroorganismen, die dem geringsten Stoffwechsel der Ameise ausgesetzt sind. Die Größe der Symbionten variiert von etwa $6 \times 0,8 \mu$ bis $14 \times 0,5 \mu$.

Es finden sich Bakterien mit ganz prägnanter Perlschnurstruktur (Abb. 11b und d) neben solchen, bei denen die Chromatineinschlüsse weitgehend geschwunden sind. Diese Symbionten unterscheiden sich aber von denen des bereits beschriebenen älteren Larvenstadiums bei Beobachtung mit dem Grünfilter durch den Besitz einer, jetzt meist noch kleinen, ovalen, orange gefärbten Einlagerung (Abb. 11b α und 11d α). Sie ist allerdings in der Mikrophotographie bei Schwarz-Weiß-Wiedergabe nur sehr schwer zu sehen. Einige Symbionten zeigen kleine Vakuolen (Abb. 11b β und 11d β). — In den kürzeren Symbionten ist die Perlschnurstruktur besonders deutlich, verblaßt aber in den zu längeren Fäden ausgewachsenen Mikroorganismen immer mehr (vgl. Abb. 11b γ und 11b δ).

Eine Verwechslung dieser langen, fädigen Mikroorganismen des Mitteldarmausstriches mit eventuell vorkommenden Bakterien des Darmlumens ist ausgeschlossen. An Hand von Querschnitten durch den Mitteldarm läßt sich leicht der Nachweis erbringen, wie Abb. 11e zeigt. Die fädigen Symbionten liegen dicht gebündelt und aufgerollt gleich einem Garnknäuel in den Mycetocyten. Bei einer Schnittdicke von 3μ wurden die längeren Symbionten mehrmals angeschnitten, weshalb die vollkommene Länge der fädigen Mikroorganismen im Schnitt nicht zur Darstellung gebracht werden kann. — Doch geht deutlich die Identität der Insassen der Bakteriocyte mit jenen Fäden im Ausstrich daraus hervor.

Es muß aber noch erwähnt werden, daß neben einfachen, fädigen Symbionten auch verzweigte Formen auftreten, wie sie in älteren Stadien der Imagines immer häufiger erscheinen.

7. 26wöchige Imagines

26 Wochen alte Imagines sind bereits aus ihrem Winterschlaf erwacht, und damit sind ihre Symbionten wieder einem regeren Stoffwechsel ausgesetzt.

Jetzt herrschen dünne, fädige Symbionten vor mit nahezu homogenem Plasma. Bei einer Dicke von $0,4\mu$ werden Längen zwischen 6 und 60μ gemessen (Abb. 12a und b). Doch sind diese Extremwerte selten. Symbionten mit deutlicher Perlschnurstruktur werden nurmehr



Abb. 12a u. b. Symbionten aus 26wöchigen Imagines. Färbung nach PIEKARSKI-ROBINOW. Vergr. etwa 1300 $\times$. Die Pfeile zeigen die Einlagerungen an

vereinzelt gefunden. Das Schwinden der DNS-haltigen Substanz in den längeren Symbiontenzuständen, auf das ich bei den Symbionten 18wöchiger Imagines hingewiesen hatte, tritt jetzt deutlicher in Erscheinung. Die bei Grünlichtbeobachtung orange sichtbaren Einlagerungen (mit Pfeilen in Abb. 12a und b angedeutet), die bereits erwähnt wurden, werden jetzt immer deutlicher und blähen die Symbionten gelegentlich partiell auf (Abb. 12b z). Im Phasenkontrastmikroskop erscheinen diese Einlagerungen am gefärbten Präparat stark aufgehell. — Die Sporenfärbung war negativ. Chemische Untersuchungen sind nicht ausgeführt worden.

8. 30wöchige Imagines

Zahlreiche Einschnürungen und kleinere Fäden weisen darauf hin, daß die langen, fädigen Symbionten sich quer teilen (Abb. 13a z). Auch die Auftreibungen der Symbionten, welche vermutlich durch Einlagerungen bedingt sind, haben sich merklich vergrößert (Abb. 13a β).

9. 34wöchige und ältere Imagines

Das Wachstum der fädigen Symbionten hält in der Folge noch an, so daß wir bei 34 Wochen alten Tieren hyphenartig ausgewachsene Fäden vorfinden, die etwas an Breite zugenommen haben. — Tiefe Einschnürungen deuten auf Teilungsprozesse, die neben Verzweigungen der Symbionten für diese Alterskategorie typisch sind. Auffallend ist ferner, daß der Winkel der Verzweigung fast durchwegs gleich ist ($82-88^\circ$ vgl. Abb. 14a und b). Die Häufigkeit, mit der um diese Zeit solche Verzweigungen auftreten und ihre verschiedene Orientierung in einem Ausstrichpräparat sprechen gegen irgendwelche Zufälligkeiten, die eventuell eine Verzweigung der Symbionten vortäuschen könnten.

Die in Abb. 13b z dargestellte elliptische Aufreibung des Symbiontenfadens habe ich in so ausgeprägter Form nur einmal beobachtet, und ich kann infolgedessen über ihre morphologische Bedeutung keine Aussagen



Abb. 13a u. b. Symbionten aus Mycetocyten des Mitteldarmepithels von *Camponotus ligniperda*. a Aus einer 30 Wochen alten Imago; b aus einer 34 Wochen alten Imago. Färbung nach PIEKARSKI-ROBINOW. Vergr. etwa 1300 $\times$

machen. — Die oben erwähnten Einlagerungen kehren auch in diesen Mikroorganismen wieder.

10. Diskussion

Aus den vorliegenden Ergebnissen geht der ausgeprägte Pleomorphismus hervor, den die Symbionten von *Camponotus* während der

Entwicklung ihres Wirtes durchmachen. Hand in Hand mit diesem Formwandel unterliegt auch die chromatische Substanz der Symbionten charakteristischen Veränderungen.

Züchtungsversuche der Symbionten lagen nicht im Rahmen dieser Arbeit, deren Ziel es ja war, das Verhalten der Symbionten im Wirtsorganismus zu studieren. — Möglicherweise führen solche Züchtungsversuche, die einer künftigen Arbeit vorbehalten sind, zu ähnlichen Ergebnissen, wie sie CARRÈRE und ROUX (1952) an *Salmonella typhimurium* erhielten. Sie überimpften diese gramnegativen Stäbchen intraperitoneal in Meerschweinchen und erhielten Riesenformen, zum Teil

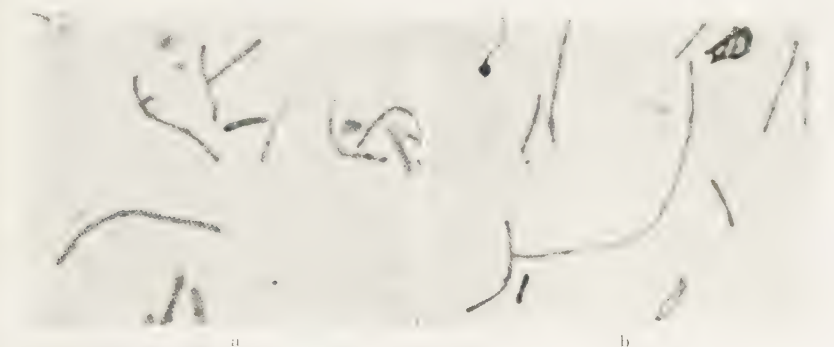


Abb. 14a u. b. Verzweigungen bei Symbionten aus 34 Wochen alten Imagines. Färbung nach PIEKARSKI-ROBINOW. Vergr. etwa 1300.

kugelige Körper, die keine Ähnlichkeit mehr mit den Ausgangsformen der Reinkultur hatten. Gerade für den Mediziner ist das Verhalten der Bakterien in lebenden Organismen von größtem Interesse. — Auch PAILLOTS (1922 und 1933) Untersuchungen an parasitischen Bakterien aus Insekten, welche in die Leibeshöhle anderer Wirte überimpft wurden, zielen in die gleiche Richtung (s. BUCHNER 1953, S. 605).

Für einen solchen an den Wirtszyklus gekoppelten Formwandel der Symbionten lassen sich zahlreiche Beispiele anführen: STAMMER (1929) beobachtete ganz extreme Formveränderungen der Symbionten von *Tephritis heisei* (Trypetiden) und WALCZUCH (1932) weist auf das Auswachsen der kurzen larvalen Symbionten von Cocciden zu langen Fäden hin. — So überrascht es nicht mehr allzusehr, daß bei den gramnegativen, stäbchenförmigen Bakterien von *Camponotus* solch lange Fäden im Laufe der Zeit entstehen. Über weitere Beispiele des Formwandels unterrichten uns SCHORR (1957) bei *Brachypelta* und BUCHNER (1953) in seiner Zusammenfassung, so daß es sich erübrigt, die von ihm zitierten Beispiele hier nochmals namentlich aufzuführen.

Verfolgt man den Entwicklungsverlauf der Symbionten im Wirt, so stellt man fest, daß der erste Vermehrungsstoß derselben bei *Camponotus*

in der Pronympe eingeleitet wird, um dann während des mittleren und älteren Puppenstadiums seinen Höhepunkt zu erreichen. Auch LILIENSTERN (1932) beschrieb bei *Formica fusca* eine Zunahme der Symbiontenmenge in diesem Stadium. BUCHNER (1953) weist auf solche auffälligen Vermehrungsstöße besonders hin. Die Symbiontenvermehrung, welche vom Wirt gesteuert wird, bringt er mit der Übertragung

Tabelle 3. *Beeinflussung der Mikroorganismen durch anorganische Substanzen*

Zeit	Autor	Reagens	Mikroorganismus	Formwandel	Kernmaterial
1930	KLIENE- BERGER, E.	LiCl	Esch. coli Vibrio cholerae	Kugelform	—
1937	NEIPP, L. (zitiert bei GRIEDER, NEIPP und MEIER 1954)	La, Ce, Pb, Hg und Ag	Ps. pyocyaneus	kurze Formen (bis Kokken- formen)	—
1954	BRAUN, H. BERG, St. KESSLER, S. MAVROIDI, P.	LiCl, CsCl, Peni- cillin	S. paratyphi B und Esch. coli	Riesenformen	1. solche, in denen Chromatin in zahl- reichen, rundlichen kleinen Brocken erscheint; 2. solche, die ein großes Chromatinkorn im strukturlösen Protoplasmaklumpen enthalten
1954	GRIEDER, F. NEIPP, L. MEIER, R.	As J	Esch. coli	bis 20fache Verlängerung polymorphe stark aufge- triebene For- men bis 4fach vergrößert	kugelförmige, subpo- lare Granulabildung ¹ polymorphe Granulation
1956	KESSLER, S.	Cs ⁺ Rb ⁺	S. paratyphi B, Proteus OX ₁₉	Riesenformen (Faden- und Wurstformen)	kleine Chromatin- körperchen. In den Fäden manchmal chromatinfreie Teile

¹ Mittels Farblösung Nr. 6120/12 der Ciba.

in Zusammenhang. Auch *Camponotus* liefert dafür eine schöne Bestätigung, wie wir noch im Kapitel über Ovarialinfektion sehen werden.

Für den auffälligen Pleomorphismus der *Camponotus*-Symbionten dürfen wohl die jeweiligen Umwelteinflüsse in der Mycetocyte verantwortlich gemacht werden. Vielleicht spielt sogar eine unterschiedliche Permeabilität der Mycetocytenmembran für gewisse Stoffe eine bestimmte Rolle. Man ist sich heute darüber klar, daß gewisse Kationen und organische Substanzen, wie auch die Stoffwechselprodukte in alten Kulturen tiefgreifende Veränderungen der Bakterien hervorrufen können. Aus Tabelle 3 und 4 sind weitere Einzelheiten zu entnehmen. WHITFIELD

und MURRAY (1956) beschreiben ausführlich, wie sich gerade die Chromatinstruktur durch hohe Salzkonzentrationen und andere Faktoren (Temperatur, Ultraviolettbestrahlung usw.) verändern läßt. Sie erhalten dabei Binnenstrukturen (Plate I, Fig. 5, S. 248), die teilweise durchaus zu vergleichen sind mit der Verteilung und Anordnung der chromatischen Substanzen, wie ich sie bei Symbionten aus Puppen und Imagines finden konnte. Sie schreiben: "the observations indicate that chromatin aggregation is a consequence of interaction of cations (Na^+ and K^+ in particular) and polymerized desoxyribose nucleic acid, which behaves as an anion gel."

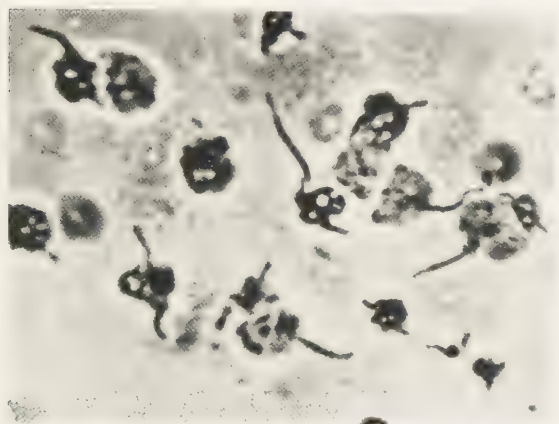


Abb. 15. *Proteus vulgaris* unter dem Einfluß einer hohen Penicillinkonzentration (nach FLEMING u. Mitarb. 1950, Tafel 3 Fig. 27)

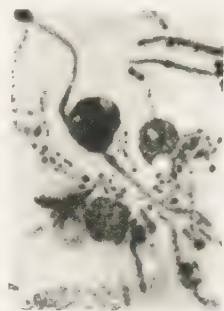


Abb. 16. Nucleoiddarstellung in Umwandlungsformen von *Proteus vulgaris* aus Penicillin riesenformen. Deckglaspräparat 90 min n-HClFuchsin. Hellfeld (nach v. PRITTWITZ 1953)

Inwieweit man aber Kationen oder Stoffwechselprodukte organischer Natur für die Ausbildung von Riesenformen und bizarren Gestalten der Symbionten in der 4wöchigen und älteren Imago verantwortlich machen muß, kann jetzt noch nicht entschieden werden. Die meisten diesbezüglichen Experimente an Bakterienreinkulturen wurden mit Antibiotica ausgeführt, wie aus Tabelle 4 ersichtlich ist. Man konnte so normale stäbchenförmige Bakterien in riesige, fädige Gebilde überführen. — Von großer Bedeutung ist, daß in alten Bakterienkulturen (ohne jeglichen Antibioticazusatz) ebenfalls solche Riesenformen auftreten (v. PRITTWITZ 1953).

v. PRITTWITZ (1953) fand bei ihren Kulturen von *Proteus vulgaris*, welche unter Penicillineinfluß standen, fädige und polymorphe Gebilde (Abb. 16) mit Vakuolen und unregelmäßigen Chromatinbrocken, ähnlich wie ich sie bei Symbionten aus 4wöchigen Imagines beschreibe. Auch FLEMING u. Mitarb. (1950) beobachteten beim gleichen Objekt, wie unter Penicillineinfluß solche bizarre, vielgestaltige, vakuolisierte Gebilde

Tabelle 4. *Beeinflussung der Mikroorganismen durch organische Substanzen*

Zeit	Autor	Reagens	Mikroorganismus	Formwandel	Kernmaterial
1940	GARDNER, A. D.	Penicillin	(Clostridium welchii und grampositive Organismen	extreme Verlängerung	keine Angaben
1947	BOUVIN, A.	Penicillin	Staphyl. aureus und Esch. coli	Riesenformen und Schwellungen	cytologische Teilung mehr gehemmt als die nucleare
1948	BRAUN, H., u. F. YALIM,	1. Penicillin 2. Sulfonamide 3. Phenol	S. paratyphi B, Streptococcus, Staphylo- coccus	Fadenformen und kaulquappenförmige Aufreibungen keine morphologische Veränderung bei Konzentration, die noch Vermehrung zuläßt Verlängerung durch kugelige und ovale Aufreibung des Protoplasmas	Vermehrung der chromatischen Sub- stanz besonders in Auftreibungen keinerlei Veränderung der Chromatin- körperchen zahlreiche ganz verschieden geformte Chromatinkörperchen
1948	TULASNE, R. u. R. MINCK,	Penicillin	Esch. coli	extreme Verlängerung; Kugeln an Filamenten	ein einziger Kern teilt sich viele Male und die langen Filamente können Hun- derte von Kernen enthalten. Schwel- lungen gefüllt mit regellos zerstreuter Kernsubstanz
1949	STERZL, J.	Colchizin kristallisiert Colchizin amorphum, Colchizin (chloroform. auch mit (chloralhydrat und Veratrin- behandlung	Esch. coli	Verlängerung verzweigte lange Zellen und oft myceliumähnliche Netze	Vermehrung der Nucleoide
1950	FLEMING, A. VOUREKA, A. KRAMER, J. R. H. HUGHES, W. H.	Penicillin	Proteus vulgaris	Verlängerungen; Fäden oft mit An- schwellungen; Verzweigungen; vakuo- lisierte Knollen und Kugeln	normal wie bei ROBINOW gehandelt; dann Abrundungen und Wiederholun- gen der Kerne im Faden. Ansammlung in Verdickungen und Verdrängung durch

1950	LEVADITI, C. u. J. HENRY- ENVENO,	Penicillin	Esch. coli, Proteus vulgaris	lange Formen, Kugeln und birnförmige Gebilde	keine spezifische Kernfärbung
1952	PULVERTART, R. J. V.	Aureomycin Chloro- mycetin Penicillin Streptomycin Terramycin	Esch. coli	lange Fäden "Cigar"-forms lange Fäden mit zentraler Kugel "Enemasyringes"-Form terminale Kondensation, Kugelformen "Cigar"-forms	keine Angaben
1953	V. PRITT- WITZ u. CAFFRON, J.	Penicillin	Proteus vulgaris	Kugel- und Fadenformen; hirsche- weilhartige Gestalten, deren Längen- wachstum zunimmt	verschieden große Chromatinbrocken, manchmal groß und klumpig; in Kugel- formen auch randständige Verteilung
1954	GRIEDER, F. NEIPP, L., u. R. MEIER,	Aureomycin Chloro- mycetin Penicillin Streptomycin Terramycin Sulfonamide Phenole Aldehyde	Esch. coli	homogene undulierende Fäden, 30fach oder mehr verlängert 2—4fach verlängert und verdickte Stellen zentrale Verdickung, bis 2fache Ver- längerung bis 4fach verlängert; zündholzartig bis 10fach verlängert bis 2fach verlängert und polymorph etwa 30fach verlängert bis 10fach verlängert	selten feinkörnige (Granulabildung) ² pfropfenförmige, blasse Granula (polar) grobkörnige Granula fast immer in Ver- dickung grobkörnig kugelige Granula kettenförmig angeordnete grobe Granula polymorphe Konglomerate kugel- und pfropfenförmig kugel- und pfropfenförmig
1956	BART- MANN, K., HÖPKEN, W.	Penicillin	Bact. faecalis aeruginosus	Fäden bei gerade wachstumshemmender Konzentration; kugelige große Zell- formen bei höheren Konzentrationen	keine Angaben
1956	PONTIERI, G.	Äthanol	Esch. coli	fadenförmige und keulen- oder kugel- förmige Zellen	zahlreiche Nucleoide (entweder in den langen Fäden aufgereiht oder rand- ständig, vielfach regellos in angeschwol- lenen, amorphen Zellen)

¹ Die Anregung zu den Tabellen 3 und 4 verdanke ich der Arbeit von GRIEDER, NEIPP und MEIER (1954).

² Mittels des Farbstoffes Nr. 6120/12 der Ciba.

(Abb. 15) entstanden. Abb. 17 zeigt eine Auswahl der häufigst vorkommenden Formen, welche die genannten Autoren bei Anwendung unterschiedlicher Penicillinkonzentrationen erhielten.

Wenn auch schon bei Vertretern der Eubacteriales solche Verzweigungen, lange Fäden und kugelig aufgetriebene Formen unter entsprechenden Bedingungen auftreten, so ist es nicht allzusehr verwunderlich, wenn auch die unter ganz besonderen Einflüssen des Wirtes stehenden



Abb. 17. Die bei verschiedenen Penicillinkonzentrationen normalerweise erhaltenen Formen von *Proteus vulgaris* (nach FLEMING u. Mitarb. 1950, Fig. 1)

den symbiontischen Mikroorganismen sich ganz ähnlich verhalten. Doch läßt erst die Züchtung dieser Symbionten eine eindeutige Aussage darüber zu.

Als weiterer Beweis, daß es sich wohl um eine alternde Symbiontenpopulation in der Mycetocyte handeln könnte, darf wohl die Tatsache angesehen werden, daß in diesen Riesenfäden die nachweisbare Chromatinsubstanz schwindet, was, wie BRAUN

und YALIM (1949) bei Salmonellen und Streptokokken ausführlich beschreiben, auf fermentativen Abbau der DNS in alten Bakterienzellen zurückzuführen ist.

Davon ausgehend wollen wir uns im nächsten Kapitel mit der Degeneration der Symbionten befassen.

VI. Degeneration der symbiontischen Mikroorganismen

Die etwa 41 Wochen alten und noch älteren Versuchstiere (Arbeiterinnen und Soldaten) zu diesen Untersuchungen stammen aus demselben Nest wie jene, deren Entwicklungszyklus bereits beschrieben wurde. Sie wurden aber nicht im Gipsnest, sondern im ursprünglichen Fichtennest bei Zimmertemperatur weiter gehalten.

Bei den etwa 34 Wochen alten Imagines wurde schon die Durchschnürung der langen Fäden in kleinere Formen bei einigen Symbionten erwähnt. In den alternden Arbeiterinnen und Soldaten ist die Zahl der Symbionten stark reduziert. Normal gestaltete symbiontische Mikroorganismen sind nur noch vereinzelt zu finden. Die noch am häufigsten anzutreffenden Symbiontenformen bringt Abb. 18 zur Darstellung.

Mikroorganismen, die noch einigermaßen die ehemalige Gestalt des Symbionten erkennen lassen und nur geringe Deformationen aufweisen, wie z. B. eine kleinere, terminale Auftreibung (Abb. 18a), trifft man nur noch selten an. Meistens ist schon der ganze Symbiontenleib von den Veränderungen erfaßt. Abb. 18b z. B. zeigt, wie solche zugrunde

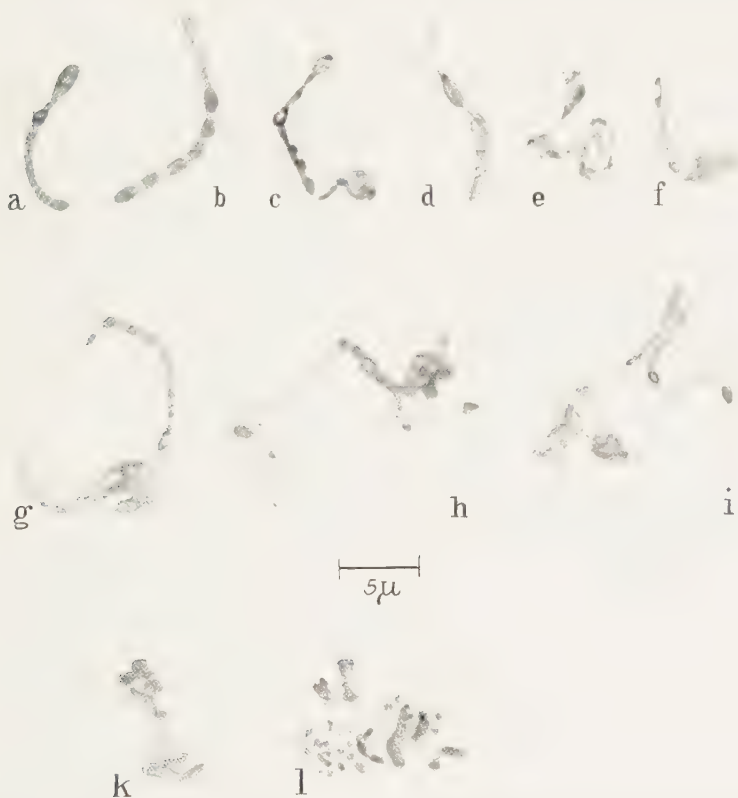


Abb. 18a—l stellt den häufigsten Weg der Bakteriendegeneration in alternden Arbeiterinnen und Soldaten von *Camponotus ligniperda* dar. a—k aus Ausstrichen, l aus einem Schnitt gezeichnet

gehenden Mikroorganismen in regelmäßigen Abständen Verdickungen zeigen, die den Zerfall in kleinere Bruchstücke bereits vorzeichnen. Die Abb. 18c—h soll nur einen kleinen Ausschnitt der Vielgestaltigkeit jener auftretenden Deformationen wiedergeben. Fast überall sind noch die Einlagerungen in den Mikroorganismen anzutreffen, die bereits bei den Symbionten von 30—34wöchigen Imagines Erwähnung fanden. Aus all diesen Formen geht die Tendenz der Abschnürung ganzer Symbiontenstücke hervor (Abb. 18d und e). Abb. 18h veranschaulicht recht gut, wie sehr der Grad der Tingierung in einem Mikroorganismus variieren

kann. Daraus ist die Tatsache leicht erklärlich, daß man unter den Fragmenten der Symbionten, die als Endprodukte auftauchen, solche findet, die schwach rosa gefärbt sind, neben jenen, die starke Affinität zu den basischen Farbstoffen aufweisen. Sehr häufig findet man einige Endosymbionten dicht beieinanderliegen, die bereits an verschiedenen Stellen Rupturen zeigen (Abb. 18i) und so einen Hinweis liefern, daß

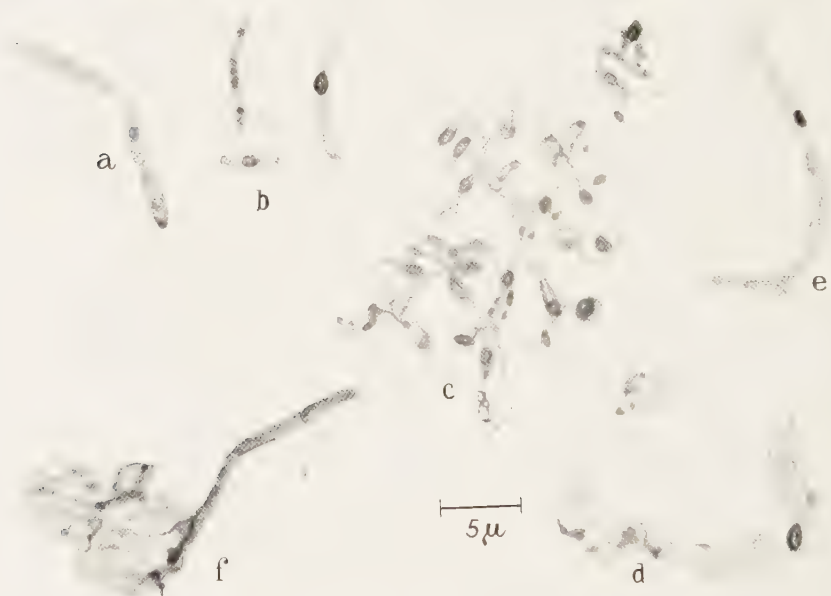


Abb. 19a—f. Weitere Erscheinungsformen der symbiontischen Mikroorganismen in alternierenden Ameisen. a Durchbruch von Kleinformen in alternierenden Arbeiterinnen; b Kleinformen; c Degeneration der Kleinformen; d vakuolisierter, selten auftretender Symbiontentyp; e breitgequollener, symbiontischer Faden aus einem alten, geflügelten Weibchen; f blasige Gebilde an einem Faden aus einem geflügelten Weibchen

die später immer häufiger auftretenden und dicht beieinanderliegenden Partikel (Abb. 18l) wirklich durch Zerfall der Symbionten entstanden sind. Nicht selten nehmen die Symbionten vor ihrem Zerfall aberrante, gelappte Gestalt an, wie sie in Abb. 18k an einem Beispiel gezeigt wird.

Mitunter scheint aber auch der Degenerationsverlauf der Symbionten in seltenen Fällen andere Wege einzuschlagen (Abb. 19a—d). Die Symbiontenfäden zerfallen kettenartig in einzelne Glieder (Abb. 19a und b), die ihrerseits dann, wie Abb. 19c zeigt, einer fortschreitenden Degeneration unterliegen. — Gelegentlich beobachtete ich auch in dieser Reihe stark aufgeblähte, vakuolierte Symbiontenschläuche (Abb. 19d).

Diese beiden, für die Symbionten alter Arbeiterinnen und Soldaten so charakteristischen Degenerationsreihen erscheinen bei etwa 2jährigen, geflügelten, unbegatteten Weibchen seltener. Hier trifft man häufig

recht lange, wesentlich dickere Fäden an (Abb. 19e und 20a), die zum Teil partiell blasig aufgetrieben sind (Abb. 19f). Deutlich zeigen diese Abbildungen die zerknitterte Wandung, die diese Blasen besitzen und die auch im Schnittmaterial an den Symbionten der Mycetocyten gut zu erkennen ist.



Abb. 20a—c. a Breite fädige Symbionten aus geflügeltem Weibchen. Färbung nach PIEKARSKI-ROBINOW. Vergr. etwa 1300 $\times$. b Schnitt (7μ dick) durch eine Mycetocyte im Mitteldarm, die degenerierte Symbionten enthält. Hämalaun-Färbung. Vergr. etwa 1310 $\times$. c Schnitt (7μ dick) durch normale Mycetocyte im Mitteldarm einer gerade geschlüpften Imago. Schnittfärbung nach PIEKARSKI-ROBINOW. Vergr. etwa 1310

Alle diese verschiedenen Symbiontenformen wurden in Ausstrichen sowohl nach der HCl-Giemsa-Färbung wie auch nach der fermentativen Behandlung angetroffen.

Auch die Mitteldarmquerschnitte dieser „alternden“ Arbeiterinnen und Soldaten zeigen in den noch vorhandenen Mycetocyten die gleichen Symbiontenformen, wie sie in den Ausstrichen erhalten wurden. Schrittweise werden in den alternden Tieren nicht nur die Symbionten, sondern

auch ein Großteil der sie beherbergenden Mycetocyten abgebaut. Man kann dann im Verband des Mitteldarmepithels deutlich noch die Lücken der zugrunde gegangenen Mycetocyten erkennen. Abb. 20b führt eine weitgehend degenerierte Mycetocyte vor Augen, deren Symbionten alle Anzeichen des Verfalls zeigen (vgl. Abb. 20b mit Abb. 18). Aus dem Vergleich mit einer prall gefüllten, normalen Mycetocyte einer jungen Imago (Abb. 20c) werden diese Unterschiede ganz besonders auch hinsichtlich der Größe hervorgehoben.

Während in der jungen Imago der ganze Mitteldarm reichlich mit Mycetocyten durchsetzt ist, die der Basalmembran aufliegen, zeigt der Mitteldarm alternder Imagines vorwiegend Lücken an den Stellen, wo ursprünglich die Mycetocyten vorhanden waren. Diese leeren Stellen weisen darauf hin, daß ganze degenerierende Mycetocyten in das Mitteldarmlumen ausgestoßen wurden. Im Darminhalt lassen sich jedoch diese Mycetocytenreste nicht mehr mit Sicherheit nachweisen.

Der natürliche Degenerationsverlauf, wie ich ihn bei *Camponotus*-Symbionten aus den Ausstrichen erschlossen habe, weist ähnliche Züge auf wie die künstlich durch Hitze und Antibiotica verursachte Degeneration der Symbionten von *Rhizopertha dominica* (HUGER 1956). Auch dort werden verschiedene Degenerationswege beschrieben, die häufig über tiefgreifende Veränderungen der symbiontischen Grundgestalt zu sich auflösenden Bruchstücken führen.

Doch fand auch SCHORR (1957) in alternden Weibchen von *Brachypelta aterrima* eine natürliche Degeneration der symbiontischen Mikroorganismen.

Degenerationserscheinungen treten überhaupt bei Symbionten häufiger auf, und zwar immer dann, wenn die Übertragung der symbiontischen Mikroorganismen gesichert ist und der Wirt den Rest seiner Insassen nicht mehr benötigt (s. BUCHNER 1953). — Auch bei *Camponotus* geht die Besiedlung des Ovars mit besonderen Infektionsformen diesen Degenerationsprozessen voraus; doch davon soll im nächsten Kapitel die Rede sein.

VII. Ovarialinfektion und Entwicklung der Symbionten

Dank BUCHNERS Untersuchungen (1928 und 1953) sind wir schon darüber orientiert, daß die Ovarien von Arbeiterinnen sowie von Königinnen bei *Camponotus* sehr frühzeitig infiziert werden, nämlich sobald sich die jungen Ovocyten hintereinander ordnen (s. BUCHNER 1928). — Im Rahmen meiner Untersuchungen sind die Strukturen der in der Ovariole und im Ei auftretenden Symbionten von Interesse.

Schnitte durch *junge Puppen* von Arbeiterinnen zeigen noch sehr kleine Ovarien, in welchen die Ovocyten und Nährzellen noch ungeordnet und frei von Symbionten zu finden sind.

In *mittleren Puppenstadien* der gleichen Kaste jedoch sind die Ovarien beträchtlich herangewachsen. Aber auch hier sind Ovocyten und Nährzellen noch nicht geordnet und noch nicht mit Symbionten infiziert. — Die Ovariolen liegen rechts und links des Mitteldarmes, so daß sie ihn mancherorts berühren. Besonders an den Stellen, an welchen sich Mitteldarm und Ovariolen nähern, beobachtet man in den Mycetocyten des Mitteldarmepithels stärker tingierte Kleinformen der Symbionten von etwa $2,5\text{--}4\mu$ Länge. Mittels der für die Schnittfärbung abgewandelten Pickarski-Robinow-Methode sind in den Mycetocyten an anderen Stellen des Mitteldarmes einige weitere Symbionten zu finden, die sogar trotz der Fixierung nach CARNOY und der dichten Packung der Symbionten im Schnitt noch schwach tingierte Parallelstruktur erkennen lassen.

In *alten Arbeiterpuppen* sind bereits die Ovariolen völlig mit Symbionten überschwemmt und die Ovocyten und Nährzellenmuster hintereinander geordnet. Man findet im oberen Teil der Ovariolen diese stark tingierten Bakterien von $2,5\text{--}4\mu$ Länge noch in den Follikel-epithelzellen verstreut. Im unteren Teil der Ovariolen besiedeln dagegen die Symbionten in Massen die Ovocyten, die hier schon beträchtlich größer sind (Abb. 21a). Die Symbionten vermehren sich in diesen Ovocyten stark und lassen zuweilen Andeutungen einer Perlschnurstruktur erkennen.

Das erweiterte Ende des Oviductes, in das die Ovariolen einmünden, sowie der Oviduct selbst, sind frei von Symbionten. Eine Infektion über den Oviduct erscheint mir daher sehr unwahrscheinlich.

Nach all diesen Befunden zu schließen, verläuft die Infektion sehr rasch. Unter der Voraussetzung, daß sie direkt vom Mitteldarm aus durch Übertritt der Symbionten in die oberen Ovariolen erfolgt, müßten in den Mycetocyten des Mitteldarmes von mittleren und älteren Arbeiterinnenpuppen solche Infektionsformen zu finden sein; und das ist tatsächlich der Fall. Auf Ausstrichen von den ziemlich kleinen Mitteldärmen solcher Puppen fand ich regelmäßig kleine, stark tingierbare Stäbchen derselben Größenordnung und Struktur, wie sie auch in den Ovariolen zu finden waren (vgl. Abb. 6b, c und d). Leider war es mir jedoch nicht möglich, den unmittelbaren Übertritt dieser Infektionsformen in die Eiröhren zu erfassen.

Die Ausbildung kurzer Infektionsformen der Symbionten harmonisiert mit Beobachtungen, wie sie für eine ganze Reihe von Symbiosen vorliegen (vgl. BUCHNER 1953).

In der *frisch geschlüpften Arbeiterin* finden wir kleine Ovarien, die nur aus einem Paar von Ovariolen bestehen, wie es auch GOETSCH (1940, Abb. 31 D) für einen Soldaten von *Messor barbarus* darstellt.

Im Schnittpräparat ergibt sich im wesentlichen dasselbe Bild wie bei den Ovariolen alter Puppen. Ein weiteres Wachstum der Eiröhren

ist nicht mehr zu verzeichnen. In einem Fall habe ich im unteren Drittel einer Eiröhre einen Symbiontenballen gefunden, der aus einer dichten Anhäufung knäuelartig aufgewundener langer Fäden bestand

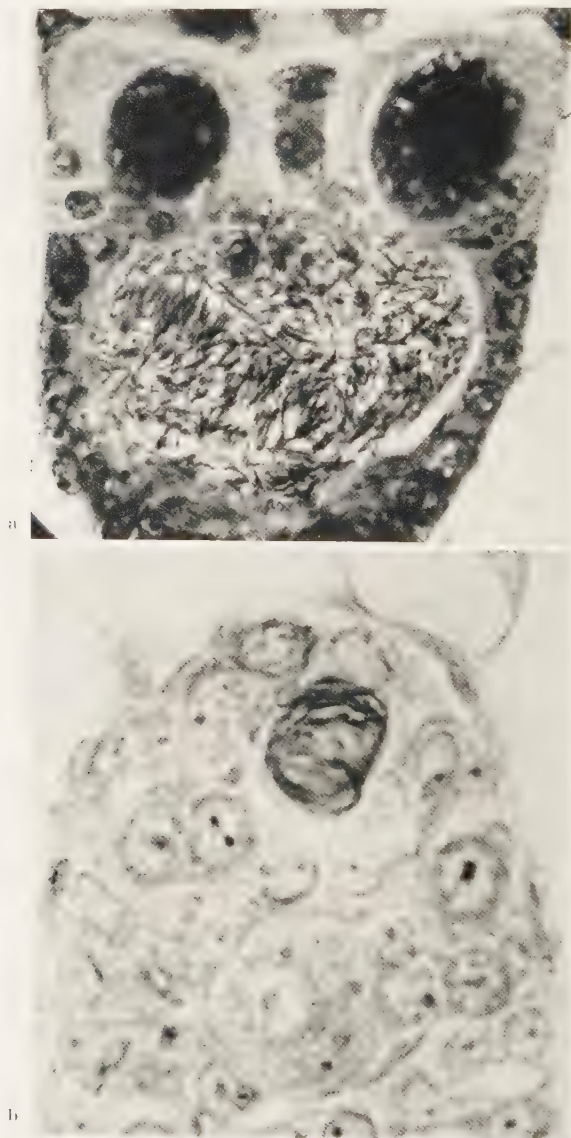


Abb. 21a u. b. Ovariolen von *Camponotus ligniperda*. a Unterer Abschnitt einer Ovarirole aus einer älteren Arbeiterinnenpuppe. Ovocyte mit Symbionten überschwemmt, während die Follikelepithelzellen nur noch wenige Symbionten enthalten und die Nährzellen völlig symbiontenfrei sind. Vergr. etwa 1000 $\times$. b Ovarirole einer frisch geschlüpften Arbeiterin. Vergr. etwa 1500 $\times$. Schnittfärbung nach PIEKARSKI-ROBINOW

(Abb. 21 b). Die benachbarten Follikelzellen waren in der bekannten Weise relativ spärlich mit kürzeren und längeren Fäden besetzt. Irgendwelche Anhaltspunkte für das Auftreten der Symbiontenansammlung konnte ich nicht finden. Ich habe sie auch kein weiteres Mal beobachtet.

Das weitere Schicksal der Symbionten läßt sich nur in den Ovarien geflügelter Geschlechtsstiere verfolgen, da ja die Arbeiterinnen normalerweise ihre Ovarien weitgehend rückbilden. Zur Untersuchung dienten

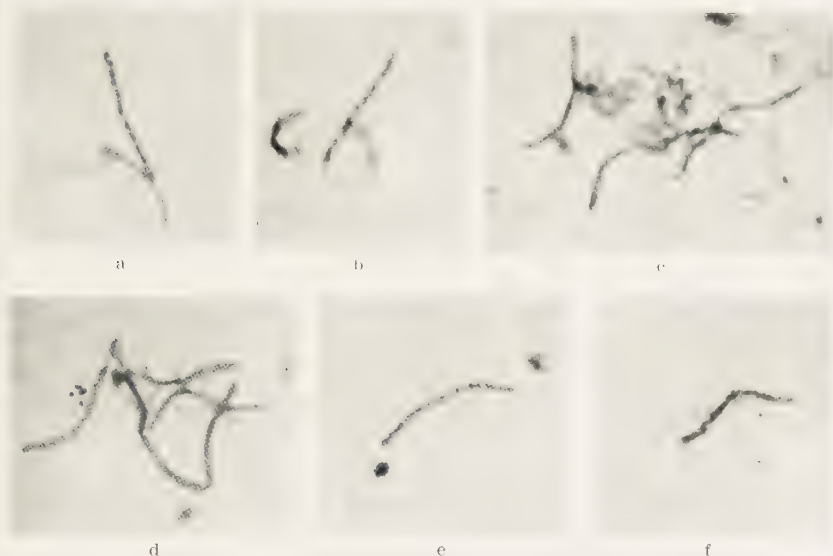


Abb. 22a—f. a und b Symbionten aus Ovariolen geflügelter Geschlechtsstiere; c und d strukturlose Symbionten von Eiausstrichen; e und f Symbionten von Eiausstrichen mit schwacher Strukturandeutung. Färbung nach PIEKARSKI-ROBINOW. Vergr. etwa 1300

dazu geflügelte Weibchen, welche aus demselben Nest stammten, aus welchem ich die Tiere für den beschriebenen Entwicklungszyklus bezog.

Hier finden wir in den Ovariolen fädige Symbionten, die fast durchweg homogen gefärbt sind und nur manchmal schwache Andeutungen einer Perlschnurstruktur zeigen (Abb. 22a und b).

Die Symbionten von Ausstrichen abgelegter Eier sind alle ziemlich gleichmäßig stark gefärbt und lassen keine Binnenstrukturen erkennen. Auch durch Verlängerung der Hydrolysezeit auf 15 min, bei welcher ich die besten Färbungen von Eiausstrichen erzielte, konnten nie kontrastreiche Strukturen der Symbionten zur Darstellung gebracht werden. — Um jede Fehlerquelle auszuschalten, wurden die Eier verschiedener Königinnen untersucht, jedoch immer die gleichen einheitlichen Resultate erzielt. Dabei ergab sich, daß während der frühen und späteren Stadien der Embryonalentwicklung keine wesentlichen Form- und

Strukturänderungen der Symbionten auftraten. Der Großteil der Symbionten sich entwickelnder Eier bestand aus homogenen, langen Fäden (Abb. 22c und d) und nur einige wenige Symbionten ließen die uns schon vertraute Perlschnurstruktur erkennen (Abb. 22e und f).

Auch die Symbionten der *Eilarven* gleichen noch morphologisch und strukturell jenen aus den Eiern.

Im *mittleren Larvenstadium* hat sich dagegen bereits eine Strukturveränderung der Symbionten angebahnt. Der homogene Symbiontentyp herrscht zwar noch vor, doch weisen da und dort Einschnürungen der Symbionten auf bevorstehende Teilungen hin. An einigen symbiontischen Mikroorganismen ließen sich trotz der starken Anfärbung des Plasmas teils Parallelstrukturen, teils Querbalkenstrukturen andeutungsweise erkennen. — Im gleichen Ausstrich kommen außerdem noch etwas schlankere Symbionten mit Perlschnurstruktur vor, welche den Anschluß an die eingangs geschilderten Symbiontenformen älterer Larven bilden.

VIII. Jahreszeitliche Untersuchungen

Der Formwechsel der Symbionten wird nach den bisher vorliegenden Erfahrungen durch Wirtseinflüsse und auch durch jahreszeitlich bedingte Außenfaktoren gesteuert. Um solchen durch den Wechsel der Jahreszeiten bedingten Formveränderungen der symbiontischen Mikroorganismen auf die Spur zu kommen, habe ich die Symbionten aus dem Mitteldarmepithel von Arbeiterinnen und Soldaten während der ganzen sommerlichen Aktivitätsperiode untersucht und miteinander verglichen. Es standen mir dazu nur solche Tiere zur Verfügung, die nach Verlassen des Nestes am Stamm abgefangen werden konnten.

Die folgenden Untersuchungen wurden von Anfang April bis Ende Oktober durchgeführt. In den übrigen Monaten befinden sich die Tiere im Winterschlaf und sind der Beobachtung nicht zugänglich.

Das Ergebnis dieser Untersuchungen war folgendes: Ganz allgemein finden wir Symbionten von etwa $4-12 \times 0,5-1 \mu$. Nur in einzelnen Ausnahmefällen erreichen einige Symbionten bis zu 30μ Länge. Bei letzteren lassen aber einige Einkerbungen die bevorstehenden Querteilungen erkennen.

Im April kann man in den Symbionten keine besondere Binnenstruktur feststellen. Viele Symbiontenformen erinnern uns an jene, wie wir sie in Eiausstrichen und Junglarven angetroffen haben. Bei einigen lassen sich gerade noch Doppelreihen von Körnchen erkennen. Eine Parallelstruktur, wie wir sie bei Symbionten aus Jungimagines vorfanden, konnte in der ausgeprägten Form bei den Bakterien älterer Tiere aus dem Freiland nie beobachtet werden.

Ein neues, häufig auftretendes Strukturbild begegnet uns zum erstenmal im Mai. Das Chromatin ist in diesen Symbionten meist auf eine

einzigste Stelle beschränkt, die niemals terminal, sondern fast immer in dem mittleren Bereich des Symbiontenleibes zu finden ist. Dabei kann das Cytoplasma stärker tingiert sein, wie z. B. im Oktober (Abb. 2a—d), wodurch die Struktur nicht so gut sichtbar wird. Im Mai erhalten wir dagegen eine distinktere Binnenstruktur (Abb. 23). — Im Juni ist dieses Strukturbild jedoch nicht so gut sichtbar. Es wird im Juli seltener und ist im August nicht vorzufinden. Im September beobachten wir es vereinzelt, und im Oktober herrscht es wieder vor, wenn auch nicht so prägnant gefärbt wie z. B. im Mai.

Vereinzelt habe ich neben dieser Symbiontenform Bakterien beobachtet, in welchen sich der ovale Chromatinkörper nach einer oder beiden Seiten zu einem „Axialfilament“ auszieht. Es ähnelt jenem, wie es DELAPORTE (1950 und 1956) bei *E. coli* und einigen anderen Mikroorganismen und KELLENBERGER (1953) bei *E. coli* beschreiben. Auch CHANCE (1957) bildet mitunter ähnliche Strukturen in seiner Arbeit über den Teilungsverlauf von *E. coli* ab. Seiner Schilderung ist zu entnehmen, daß bei *E. coli* die Teilung anders verläuft als bei den Symbionten von *Camponotus*.

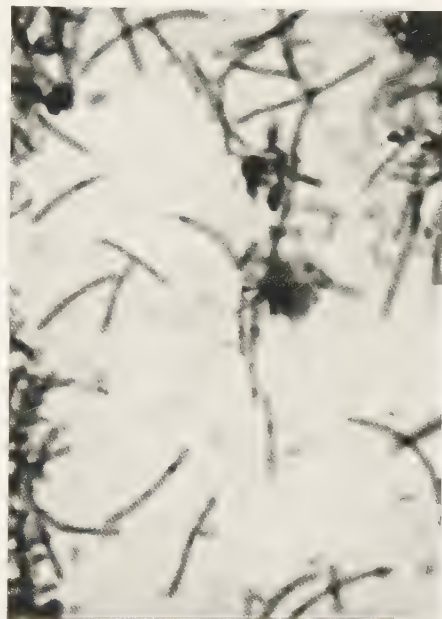


Abb. 23. Ausstrich der *Camponotus*-Symbionten im Mai. Vergr. etwa 1360 ×

CHANCE weist besonders auf Ähnlichkeiten der Teilungsfiguren von *E. coli* mit jenen von höheren Organismen hin, wofür nach meinen Untersuchungen bei *Camponotus*-Symbionten keinerlei Anhaltspunkte vorliegen.

Da und dort ließen einige wenige Mikroorganismen sogar eine spiralige chromatische Struktur erkennen. Sie ähnelt jener, die KRIEG (1953 und 1954) mittels Fluochromen als „Kernspirale“ bei *E. coli*, *Proteus vulgaris* und anderen Bakterien darstellt.

Bei den Symbionten von *Camponotus* sind jedoch Mikroorganismen mit „Axialfilamenten“ sowie auch mit „Kernspiralen“ nur äußerst selten vorzufinden und deshalb niemals als Normalform zu betrachten.

Im Juni finden wir schon vereinzelt einige Symbionten mit Perlschnurstruktur, wie sie uns bereits von Symbionten aus dem

Entwicklungszyklus bekannt ist. Diese Symbiontenform nimmt an Zahl im Juli zu, erreicht ihren Höhepunkt im August, nimmt im September wieder ab und fehlt im Oktober völlig.

Diese monatlichen Untersuchungen von Freilandtieren zeigen, daß im jahreszeitlichen Wechsel und unter den klimatischen Bedingungen des Naturnestes gewisse Abweichungen von jenen Formen vorkommen, wie wir sie im Verlaufe der Wirtsentwicklung kennengelernt hatten. Dazu kommt noch ein Symbiontenstadium mit einer Zusammenballung des Chromatins zu einem ovalen Körper (Abb. 23), wie ich es in Tieren aus Kunstnestern niemals beobachtet habe. — Wollen wir die Symbionten von Tieren im Außendienst mit jenen aus dem Entwicklungszyklus vergleichen, so müssen wir den Jahresrhythmus von *Camponotus* und alle äußeren Einflüsse miteinbeziehen.

GOETSCH (1940) beschreibt die klimatische Abhängigkeit von *Pogonomyrmex* im jahreszeitlichen Rhythmus (s. GOETSCH 1940, Abb. 90). — Eine ähnliche Kurve mit einem Maximum im Juni ließe sich auch für *Camponotus* im Bereich der Münchener Umgebung aufstellen. Diese Kurve würde mit dem Einsetzen der Aktivität im Ameisenstaat anfangs April beginnen und schon Ende Oktober mit dem Beginn der Winterruhe endigen.

Wie bereits erwähnt wurde, haben wir es bei den im Außendienst stehenden Ameisen durchschnittlich bis Juli mit letztjährigen Tieren zu tun, die dann erst von Arbeitern und Soldaten der diesjährigen Brut abgelöst werden. Von Juli/August an können wir also zusätzlich mit einer zweiten diesjährigen Generation von Imagines im Außendienst rechnen. Daraus erklärt sich wohl das Vorkommen jener Symbionten mit Perlschnurstruktur, welche den Symbionten der vorjährigen Ameisengeneration parallel laufen, von Juli/August an auftreten, und welche ich der inzwischen in den Außendienst getretenen Frühjahrsgeneration zuordnen möchte. Markierte Tiere mit genauer Altersbestimmung standen mir nicht zur Verfügung, so daß diese Beobachtungen an den Symbionten der Freilandtiere zunächst noch als vorläufige Mitteilung gewertet werden müssen.

Es ist verständlich, daß auf Grund dieser Faktoren (Jahreszeit und Biologie im Staatenwesen) keine kontinuierlichen Übergänge der Ausbildung der Symbionten bei aufeinanderfolgenden Freilanduntersuchungen an verschieden alten Tieren zu finden sind.

Aus diesen Ergebnissen geht die Bedeutung hervor, die solchen Einflüssen auf die Symbionten zukommt. Es wäre nun interessant, die Frage zu klären, auf welchen sekundären Faktoren die Abweichungen vom Entwicklungsverlauf beruhen. — Die Voraussetzung dazu ist aber die Züchtung dieser Symbionten in Reinkultur.

B. *Aphrophora salicis* DE G.

I. Die symbiontischen Einrichtungen

Die Weidenschauumzikade, *Aphrophora salicis*, aus der Familie der *Cercopidae*, zur Unterfamilie der *Aphrophorinae* gehörig, fällt durch ihre Schaumbildung von Mai bis Juli an windstill gelegenen Weiden besonders auf. Meine Untersuchungen erstrecken sich auf die Hauptsymbionten von Larven verschiedensten Alters bis zur Imago.

Unser Wissen über die Symbiose von *Aphrophora salicis* verdanken wir BUCHNER (1912 und 1925), der diese Zikade unter vielen anderen einer eingehenden Studie unterzogen hat. Dort sind auch Einzelheiten über diese Symbiose nachzulesen. Uns soll lediglich interessieren, daß die a-Symbionten dieser disymbiontischen Zikade in den intensiv rot gefärbten, paarig angelegten Hauptmycetomen untergebracht sind. — 1938 hat sich RESÜHR im Rahmen einer vergleichenden Symbiontenstudie unter anderem genauer mit der Morphologie der Hauptsymbionten von *Philaenus spumarius* befaßt; die gleichfalls im Hauptmycetom untergebrachten a-Symbionten der Wiesenschauumzikade gleichen auffallend jenen von *Aphrophora alni* FALL.

II. Die Symbionten

Die Hauptsymbionten stellen große, gewundene, gramnegative Schläuche dar, die eine Länge bis zu etwa 300μ erreichen können und öfters noch seitliche Auswüchse und Verdickungen aufweisen. Bei Anwendung der Ziehl-Nelson-Färbung verhalten sie sich nicht säurefest. Ihre große Empfindlichkeit gegenüber elektrolitischen und anelektrolitischen Präparationsmedien, sowie auch gegenüber mechanischer Beanspruchung beim Ausstreichen veranlaßte mich, das Präparationsgemisch nach RESÜHR zu verwenden. Erst so gelang es mittels Heben und Senken der angeschlitzten, frisch herauspräparierten Mycetome annähernd unversehrte Symbionten zu erhalten.

Um festzustellen, ob diese Schlauchformen Kernäquivalente wie „echte Bakterien“ besitzen, wurden folgende verschiedene Methoden zur Darstellung der DNS an den ausgestrichenen Mikroorganismen angewandt:

1. HClO_4 -Methode nach CASSEL, um eventuelle Kunstprodukte, die bei warmer Hydrolyse entstehen könnten, auszuschließen.
2. HCl-Giemsa-Färbung nach PIEKARSKI-ROBINOW.
3. Enzymatische Verdauung mit folgender Giemsa-Färbung.
4. Feulgensche Nuclealreaktion an Schnitten.

1. Ergebnisse der HClO_4 -Methode nach CASSEL

Die Ausstriche wurden 2 min in OsO_4 -Dampf feucht fixiert, dann etwas getrocknet und sofort mit n- HClO_4 (10%ig) bei 6°C behandelt; danach in Wasser gewaschen und mit 0,1%iger wäßriger basischer Fuchsinlösung meist 1 min gefärbt.

Das Ergebnis blieb dasselbe, ob die HClO_4 29, 35 oder sogar 70 Std einwirkte. Die Schlauchformen tingierten sich rosa, einige waren völlig homogen durchgefärbt, andere zeigten partiell kräftigere Nuancen des blaß-rosa Farbtons. Es traten keine Binnenstrukturen auf. Schlanke Stäbchen, die wahrscheinlich parasitär vorhanden waren, und welche mit ausgestrichen wurden, zeigten dagegen hintereinander aufgereihete chromatische Strukturen (perlschnurartig) und bewiesen dadurch, daß die Färbemethodik richtig durchgeführt wurde.

2. Ergebnisse der HCl -Giemsa-Methode

Für die HCl -Giemsa-Färbung wurden die Symbiontenausstriche noch feucht über 2%igem OsO_4 -Dampf fixiert und dann in gleicher Weise, wie das bei den *Camponotus*-Symbionten bereits beschrieben wurde, weiterbehandelt.

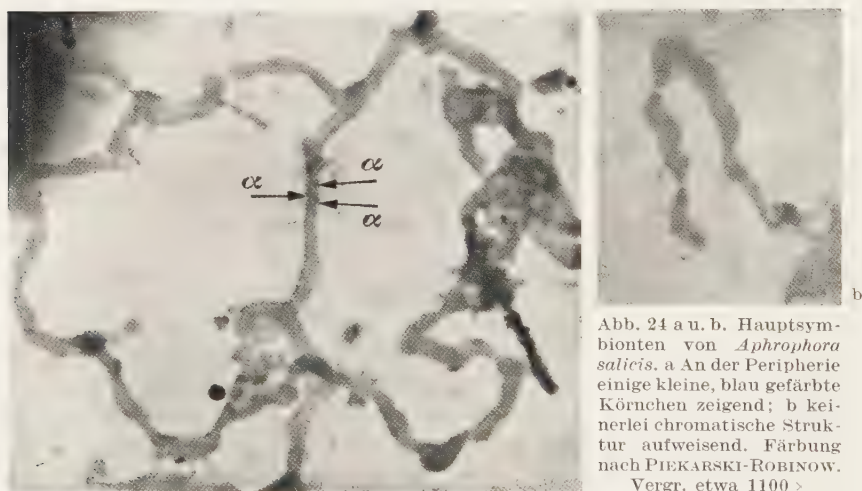


Abb. 24 a u. b. Hauptsymbionten von *Aphrophora salicis*. a An der Peripherie einige kleine, blau gefärbte Körnchen zeigend; b keinerlei chromatische Struktur aufweisend. Färbung nach PIEKARSKI-ROBINOW. Vergr. etwa 1100 >

Die Ergebnisse waren auch nicht viel besser als bei der HClO_4 -Methode, obwohl ich Farbstoffkonzentration, Hydrolysezeit und Färbedauer in mannigfacher Weise variierte. Bei einer Farbstoffkonzentration von 4 cm^3 Giemsa auf 50 cm^3 Puffer, Hydrolysezeiten von 20—30 min und einer Färbedauer von 60—95 min, erhielt ich homogen rosa durchgefärbte Symbiontenschläuche, welche keinerlei Binnenstruktur erkennen lassen. — Weitere Untersuchungen, in welchen die Farbstoffkonzentration, Hydrolyse- und Färbezeiten stufenweise variiert wurden, erbrachten ebenfalls keinerlei DNS-haltige Binnenstrukturen (vgl. Abb. 24 a und b)¹. Die mit Pfeilen in Abb. 24 a angedeuteten Körnchen stellen lediglich dem Symbionten aufliegende Verunreinigungen aus dem Plasma der Mycetocyten dar.

¹ Zu diesen Experimenten wurde der Farbstoff auf 1 cm^3 Giemsa in 50 cm^3 Puffer ($\text{pH} = 7,2$) verdünnt. Die Hydrolyse wurde in einer Zeitspanne von 3—30 min angewandt. Die Färbezeiten betrugen 10—45 min.

Da und dort enthalten die a-Symbionten vereinzelt einige Einschlüsse, auf die ich im Abschnitt über die Cytochemie der Hauptsymbionten noch zu sprechen komme.

Weitere Untersuchungen dienten dazu, diese Ergebnisse zu erhärten. Zunächst fand die sehr schonende Methode, die sich des enzymatischen Abbaus der Ribonucleinsäure bedient, Verwendung.

3. Untersuchungen mit Ribonuclease

Nach dem Fixieren und Waschen wurden die Ausstriche zwischen 25 und 45° C verschieden lang (10—20 min) mit 0,02%iger Ribonucleaselösung behandelt. Nach anschließender Wässerung der Präparate wurden letztere mit Giemsa (2 cm³ auf 100 cm³ Puffer, p_H=7,2) 15—35 min gefärbt und in destilliertem Wasser geschwenkt.

Die nach dieser Methode behandelten Mikroorganismen erscheinen etwas breiter und aufgelockerter als jene nach der HCl-Einwirkung. Eine Binnenstruktur konnte auch hier nicht dargestellt werden.

4. Feulgensche Nuclealreaktion an Schnitten

Da diese bereits beschriebenen Färbemethoden übereinstimmend keinen Nachweis für Binnenstrukturen erbrachten, wurde die Feulgensche Nuclealreaktion an Schnitten durchgeführt.

Die Larven wurden im Gemisch nach CARNOY fixiert, in Paraffin eingebettet und 7—9 μ dick geschnitten. Nach 6—8 min Hydrolyse in normaler Salzsäure bei 60° C brachte ich die Schnitte für 4½ Std in fuchsin-schweiflige Säure (aus Diamantfuchsin hergestellt). Darauf folgte gründliches Auswaschen in SO₂-Wasser in drei Passagen je eine halbe Stunde und längeres Wässern. Die Zeiten der Nachbehandlung müssen genau eingehalten werden (s. HAGEDORN 1955).

Die Hauptmycetome sind hier kaum zu erkennen, da ihre Schlauchsymbionten farblos oder nur äußerst schwach rosa erscheinen. Diese a-Symbionten sind eindeutig feulgen-negativ im Gegensatz zu den Kernen des Mycetoms und der übrigen Gewebe, welche alle tiefrot-violett tingiert sind.

Die im Nebenmycetom untergebrachten Symbionten dagegen ließen eine schwach feulgen-positive Reaktion erkennen.

Dieses Ergebnis wurde noch bestätigt durch Schnittfärbungen nach PIEKARSKI-ROBINOW, welchen ebenfalls eine Salzsäurehydrolyse während 8—10 min vorausging. — In diesen Präparaten sind die Hauptsymbionten rosa tingiert zu erkennen wie bereits in den Ausstrichen, welche nach der HCl-Giemsa-Methode behandelt wurden; die Nebensymbionten dagegen sind stark violett-blau gefärbt (vgl. Abb. 25).

5. Zur Cytochemie der Hauptsymbionten

Nachdem es nicht möglich war, DNS in den Zikadensymbionten nachzuweisen, versuchte ich mit cytochemischen Methoden Aufschluß

über die Natur der Einschlüsse in solchen Hauptsymbionten zu bekommen.

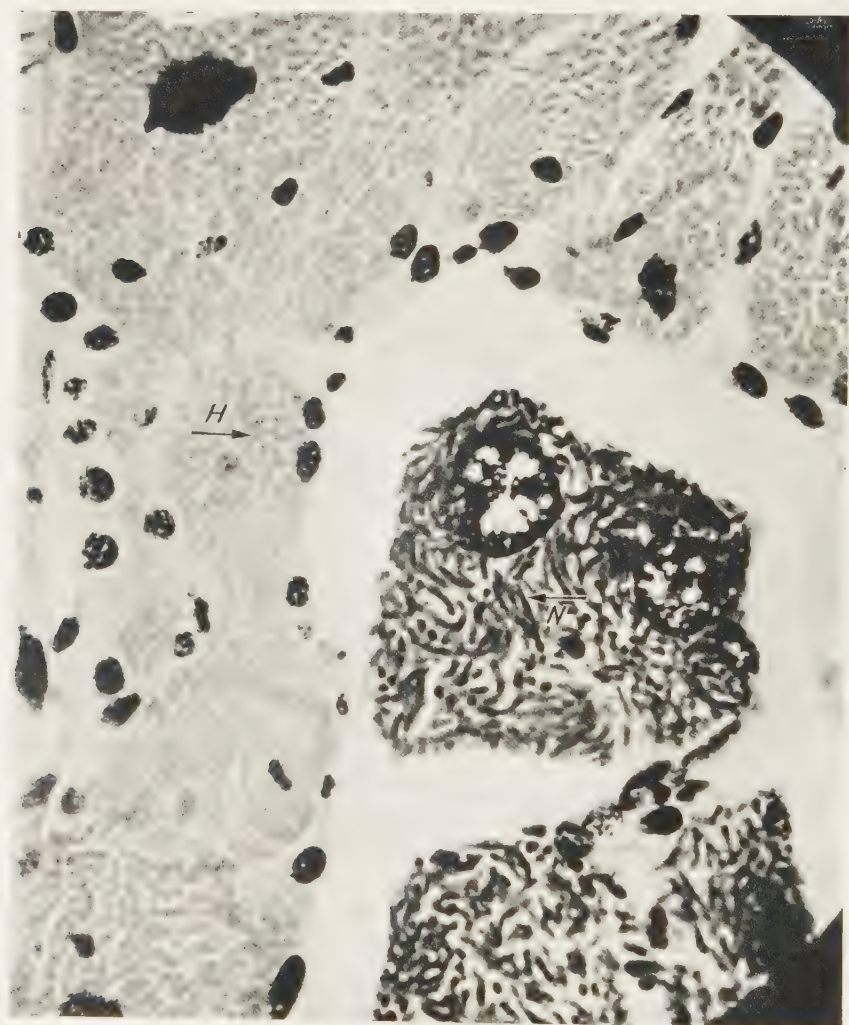


Abb. 25. Längsschnitt durch das Haupt- und Nebenmycetom von *Aphrophora salicis*.
 H ist Anschnitt eines Hauptsymbionten, N Anschnitt eines Nebensymbionten.
 Schnittfärbung nach PIEKARSKI-ROBINOW. Vergr. etwa 650 ×

Bei diesen kleinen Objekten sind nur mikrochemische Gruppenreaktionen auf Fette, Eiweißstoffe und Kohlenhydrate brauchbar, soweit es überhaupt möglich ist, etwas mit diesen einfachen histochemischen Methoden über die Natur der Einschlüsse auszusagen. — Da die ziemlich derbe Mycetomhülle ein rasches Eindringen der Reagentien verwehrt,

war es nötig, die isolierten Mycetome in dem betreffenden Agens aufzuschlitzen und darin lebend oder entsprechend vorbehandelt weiter zu verarbeiten.

a) Prüfung auf Fette. Nach der Vorschrift im Romeisschen Taschenbuch wurde mit Sudan III auf Fette geprüft. Diese Methode führte zu einem negativen Ergebnis. Auf einem zweiten Objektträger führte ich die Blindprobe an kleinen Fettspuren durch, die sich außerhalb des Mycetoms befanden. Die Orangefärbung bestätigte hier, daß die Analyse richtig durchgeführt wurde. — Auch der Nachweis mit Nilblausulfat und anschließender polarisationsoptischer Untersuchung brachte ein negatives Ergebnis¹. — Der Fettnachweis durch Osmierung fiel, wie die Vorbehandlung meiner Ausstriche mit OsO_4 -Dämpfen für die Pickarski-Robinow-Färbung ergab, negativ aus.

Es steht also fest, daß Neutralfette oder Lipide in nachweisbaren Mengen in den Symbionten bzw. deren Einschlüssen nicht vorhanden sind.

b) Prüfung auf Eiweißstoffe. Die Ninhydrinreaktion verlief positiv. Jedoch ging die Millonsche Reaktion langsam vor sich: nach 5 Std war noch keine Reaktion festzustellen; erst nach 15 Std erschien die orangefarbene Färbung in den Symbionten und bestätigte das Vorhandensein von Eiweißstoffen im Symbiontenplasma.

c) Prüfung auf Kohlenhydrate. Zunächst wurde mit Phenylhydrazin (Merck) nach der Methode von FISCHER, die SENFT in die Histochemie einführte, gearbeitet. Der gelbe Osazon-Niederschlag war nach 16 Std besonders an der Peripherie der Mikroorganismen zu erkennen.

Auch die Untersuchungen mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (Merck) bestätigte das Vorhandensein von Kohlenhydraten. Die rote Färbung entstand besonders an der Symbiontenmembran und deutet darauf hin, daß die wandständigen Einlagerungen Kohlenhydrate enthalten.

Der Glykogenachweis mit J-JK verlief negativ (vgl. RESÜHR 1938).

Aus all diesen Untersuchungen geht hervor, daß die Symbionten weder Polysaccharide wie Glykogen noch Fett in nachweisbaren Mengen enthalten. Wie zu erwarten war, verlief die Eiweißreaktion positiv, doch läßt der Kohlenhydratnachweis, der besonders an der Peripherie der Symbionten erkennbar ist, darauf schließen, daß jene körnigen Gebilde Mono- oder Dissaccharide enthalten.

III. Diskussion

RESÜHR wies schon 1938 auf die Ähnlichkeit der Hauptsymbionten bei *Cercopithecus* hin. „Alle bisher untersuchten *Philaenus*-Arten besitzen den als Hauptsymbiont bezeichneten Organismus, der offenbar identisch

¹ Herrn Dr. STOCKHAMMER danke ich für den Hinweis auf diese Methode.

ist mit einem gleich oder ähnlich gestalteten Organismus aus dem Mycetom von anderen *Cercopidae*, z. B. der zu den vorliegenden Untersuchungen auch bisweilen herangezogenen *Aphrophora alni* FALL., oder Angehörigen anderer Zikadenfamilien.“ — Nach neueren Erkenntnissen (s. BUCHNER 1953) gehören die Symbionten des Hauptmycetoms von *Aphrophora salicis* demselben Symbiontentyp (a-Symbionten) an wie die Insassen der Hauptmycetome von *Philaenus*.

RESÜHR (1938) versuchte vergeblich, an den Hauptsymbionten von *Philaenus spumarius* mittels der Feulgenschen Nuclearreaktion und der Eisenhämatoxylin-Färbung nach HEIDENHAIN, Kernäquivalente darzustellen. Vergleichsweise habe ich auch einige Präparate der Symbionten von *Philaenus spumarius* herangezogen. In Übereinstimmung mit meinen Ergebnissen an den *Aphrophora*-Hauptsymbionten und den Resultaten von RESÜHR verlief auch hier der Nachweis auf DNS negativ.

Bei den Hauptsymbionten von *Aphrophora* verwandte ich, um ganz sicherzugehen, mehrere Kernfärbungsmethoden. — Die Tatsache jedoch, daß bei der HCl-Giemsa-Methode die Mehrzahl der Symbionten keinerlei Binnenstruktur erkennen ließ (Abb. 24 b), trotz vielseitiger Veränderungen der Hydrolyse- und Färbezeit, ließ schon darauf schließen, daß keine Kernäquivalente in diesem Stadium der Symbionten zur Darstellung zu bringen sind.

Vergleichen wir alle diese Untersuchungen mit jenen, die von RESÜHR (1938) an den Symbionten von *Philaenus spumarius* durchgeführt wurden, so stellen wir die Ähnlichkeit der gramnegativen Hauptsymbionten beider Wirte mehr und mehr fest. Auch die chemischen Reaktionen führten mit anderen Methoden zu den gleichen Ergebnissen. Ferner läßt die Empfindlichkeit der Symbionten gegenüber Elektrolyten und Anelektrolyten vermuten, daß in den sie beherbergenden Hauptmycetomen beider Wirte ähnliche physiologische Bedingungen herrschen.

Diese experimentellen Befunde liefern einen erneuten Hinweis dafür, daß die von BUCHNER (1953) als a-Symbionten bezeichneten Hauptsymbionten von *Aphrophora* und *Philaenus* dem gleichen Symbiontentyp angehören und womöglich schon bei der Stammform der Familie *Cercopidae* vorhanden waren.

C. Verschiedene Insekten

Die Symbionten von

1. *Pediculus vestimenti* BURM.

RIES schilderte schon 1931 die zyklischen Formveränderungen der Symbionten von *Pediculus* an Hand von Schnittmaterial. — 1956 ergänzte PUCHTA diese Untersuchungen in einigen Punkten, als er die

lebenden Symbionten eingehend mit dem Phasenkontrastmikroskop untersuchte. Er wies in Symbionten aus dem Mycetom von frisch geschlüpften Larven 1—10, seltener noch mehr distinkte Einschlüsse nach, die er als Kernäquivalente deutete. — KOTTER (1955) jedoch, der ebenfalls diese Mycetomsymbionten aus dem ersten Larvenstadium untersuchte, konnte mit Hilfe der Robinow-Färbung nie als Kernäquivalente anzusprechende Strukturen bei diesen Mikroorganismen finden.

Deshalb erschien mir eine nochmalige Untersuchung dieses Objektes lohnenswert, und ich überprüfte die Symbionten aus den verschiedenen Entwicklungsstadien des Wirtes, um auf diese Art ein für die Darstellung der Kernäquivalente günstiges Stadium zu erfassen. — Die äußere Morphologie der Symbionten wird hier nicht mehr betrachtet, da sie bereits PUCHTA (1956) ausführlich behandelte.

Ich erhielt folgende Ergebnisse: Weder bei den *Symbionten der Eilarven*, noch bei jenen des *zweiten Larvenstadiums* war es mir möglich, trotz mehrfacher Variation der Hydrolyse- und Färbezeiten bei der HCl-Giemsa-Färbung nach PIEKARSKI-ROBINOW¹ Binnenstrukturen nachzuweisen. Die gleichen Ergebnisse erhielt ich auch mit der enzymatischen Methode² und dem HClO₄-Verfahren nach CASSEL³. Das Cytoplasma der Symbionten färbte sich homogen mit basischen Farbstoffen an, wobei die Färbbarkeit der einzelnen Symbionten oft recht unterschiedlich war.

Symbionten des dritten Larvenstadiums wurden mit der HCl-Giemsa-Färbung und dem Farbstoff Nr. 6120/12 der Ciba (GRIEDER, NEIPP und MEIER 1954) untersucht und erwiesen sich ebenfalls als strukturlos.

In *ausgewachsenen Weibchen* waren die Symbionten bereits in die Ovarialampullen abgewandert und zeigten auch dort niemals eine Binnenstruktur.

Die abgelegten *Eier* wurden nach CARNOY fixiert, 3—5 μ dick geschnitten und mit der Feulgenschen Nuclealfärbung untersucht (6—8 min Hydrolyse, 4 $\frac{1}{2}$ —5 Std Schiffssches Reagens).

In Eiern, die sich im Stadium etwa 24 Std nach der Rückrollung, sowie 38 Std⁴ vor dem Schlüpfen befanden, verhielten sich die Symbionten feulgen-negativ.

¹ Bei den Untersuchungen der *Pediculus*-Symbionten wurde mit einer Farbkonzentration von 1—1,5 cm³ Giemsa auf 50 cm³ Puffer, einer Hydrolysezeit von 5—20 min und einer Färbedauer von 10—35 min gearbeitet.

² 0,02%ige Ribonucleaselösung ließ ich 10—20 min bei 37° C einwirken und färbte 10—20 min nach.

³ Die Perchlorsäure wurde 24—45 Std bei 8° C angewandt und mit 0,1%iger wäßriger Diamantfuchsinlösung nachgefärbt.

⁴ Siehe BAUDISCH 1958.

Wir müssen somit KOTTERS diesbezügliche Untersuchungen bestätigen und zudem feststellen, daß die Symbionten in keinem Stadium des Wirtes Desoxyribonucleinsäure in färberisch nachweisbaren Mengen enthalten, die als „Kernäquivalente“ zu deuten wäre.

2. *Oryzaephilus surinamensis* L.

Über die Symbiose des Getreideplattkäfers, *Oryzaephilus* s. (*Cucujidae*), sind wir durch die Arbeiten von PIERANTONI (1929 und 1930) und KOCH (1930, 1931 und 1936) gut unterrichtet. KOCH (1931) beschrieb unter anderem den Pleomorphismus, den diese Symbionten während der Entwicklung ihres Wirtes erfahren.

Meine Untersuchungen beziehen sich auf die großen, schlauchförmigen Symbionten sehr junger Imagines.

Diese gramnegativen Mikroorganismen können bis zu 150μ Länge und $1,5-2\mu$ Breite erreichen und teilweise Verzweigungen und blasige Auftreibungen zeigen, auf die KOCH (1931) schon hinwies.

Die Symbionten wurden nach folgenden Methoden untersucht:

- a) HCl-Giemsa-Färbung;
- b) HClO_4 -Methode;
- c) Enzymatische Untersuchung mit Ribonuclease;
- d) Feulgensche Nuclealreaktion.

a) Bei der HCl-Giemsa-Färbung zeigte sich recht auffällig die Bedeutung, die der Farbstoffkonzentration zukommt. Konzentrationen von 4 cm^3 Giemsa auf 50 cm^3 Puffer erzeugten überall starke blaue Überfärbungen. Auch erwies sich $2/50\text{ cm}^3$ Puffer als ungeeignet. — Erst mit Lösungen, die 1 cm^3 Giemsa in 50 cm^3 Puffer enthielten, konnten gute Ergebnisse erzielt werden. — Eine Hydrolysezeit von 20 min und eine Färbedauer von 10—15 min erwies sich als brauchbar.

Die Symbionten sind völlig mit Vakuolen durchsetzt, die auch KOCH (1931) erwähnte. Dadurch erhält das Cytoplasma eine netzartige Struktur. Außerdem treten in dem plasmatischen Maschenwerk kräftiger gefärbte Körnchen verschiedener Größe auf (Abb. 26a).

b) Durch die HClO_4 -Methode wird das vorige Ergebnis bestätigt (Einwirkungsdauer der HClO_4 40 Std bei 50°C).

c) Bei der Fixierung nach CHABAUD und der Behandlung mit Ribonuclease (RNase-Einwirkung während 10—25 min bei 37°C und 10 bis 15 min Nachfärbung) quellen die Symbionten zwar etwas auf (Abb. 26b), doch wird die netzartige Struktur des Cytoplasmas mit den körnigen Einlagerungen wesentlich deutlicher dargestellt.

d) Die Feulgensche Nuclealreaktion wurde an 10μ dicken Schnitten durchgeführt und ergab eine eindeutig feulgenpositive Reaktion in den Symbionten.

Wie wir aus diesen Resultaten sehen, ist die Deutung der DNS-haltigen Substanz hier beträchtlich erschwert durch die netzige Struktur des Cytoplasmas. In ihr sind aber deutlich dunkler getönte Körnchen zu erkennen, die auch chromatische Substanz enthalten müssen, wie es die Feulgenreaktion bestätigt. — Doch was hier nun als DNS endgültig

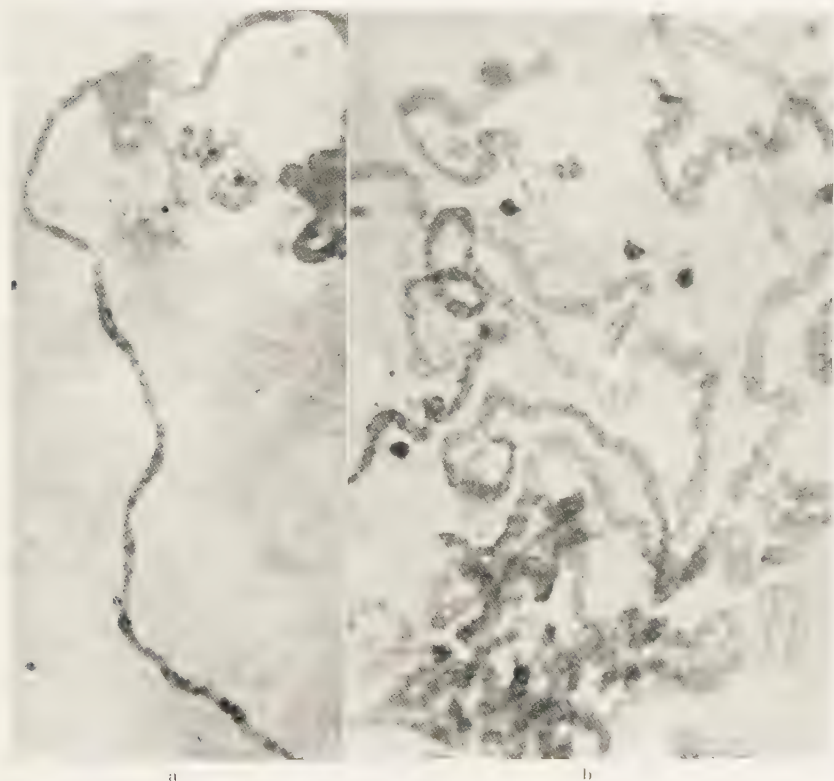


Abb. 26 a u. b. Mycetomausstriche junger Imagines von *Oryzaephilus surinamensis* L. a HCl-Giemsa-Färbung nach PIEKARSKI-ROBINOW; b Ribonuclease-Behandlung mit anschließender Giemsa-Färbung. Vergr. etwa 1240 $\times$

gedeutet werden muß, kann erst das Resultat einer folgenden DN-ase-Verdauung¹ zeigen, ohne die in diesem Fall keine Entscheidung getroffen werden darf.

3. *Calandra oryzae* L.

Über die Symbiose von *Calandra oryzae* berichteten PIERANTONI (1927), MANSOUR (1930 und 1934), BUCHNER (1930 und 1933), TARSIA IN CURIA (1933), SCHEINERT (1933), KOCH (1936) und SCHNEIDER (1956).

¹ Leider war es nicht möglich, für diesen Versuch, der später ausgeführt wurde, nochmals Desoxyribonuclease aus dem Ausland zu beschaffen.

Da es sich hier um grampositive, fädige Symbionten handelt und bisher nur gramnegative Mikroorganismen bei meinen Untersuchungen Verwendung fanden, überprüfte ich auch diese Symbionten mit den üblichen Kernfärbungsmethoden. Dazu muß jedoch eingeräumt werden, daß nur Symbionten aus den Germarien der Ovariolen von Imagines zu den Versuchen verwendet wurden.

Die Färbungen erbrachten an den etwa 3—14 μ langen und 0,5—0,9 μ dicken Symbionten folgende Ergebnisse:

a) Mit der HClO_4 -Methode können keinerlei Strukturen dargestellt werden. (Die Perchlorsäure wurde dazu 40 Std bei 5° C angewandt.)

b) Auch mittels der HCl-Giemsa-Färbung bei Farbkonzentrationen von 4 cm³ sowie 1 cm³ Giemsa auf 50 cm³ Puffer — während Hydrolysezeiten von 5—20 min und Färbezeiten von 20—90 min — erweisen sich die *Calandra*-Symbionten als strukturlöse, fädige, sehr dünne Mikroorganismen, deren homogenes Plasma meist durch eine, manchmal auch zwei kleine Vakuolen unterbrochen wird.

c) Dieses Ergebnis wird auch durch die Giemsa-Färbung nach Ribonuclease-Einwirkung bestätigt. Die RN-ase-Lösung wurde 15 bis 20 min bei 37° C angewandt; mit einer Giemsa-Lösung (1:50) wurde 10—15 min nachgefärbt.

d) Auch die Feulgensche Nuclealreaktion, die an Schnittmaterial ausgeführt wurde, verläuft negativ. Diese Untersuchungen zeigen, daß die Symbionten aus den Endkammern der Ovariolen von *Calandra oryzae* keine DNS in strukturell lichtoptisch faßbarer Form enthalten. Es wäre aber noch interessant, festzustellen, ob diese symbiontischen Bakterien, die sich in den verschiedenen Wirtsstadien besonders in ihrer Länge unterscheiden (vgl. SCHEINERT 1933), in anderen Entwicklungsphasen von *Calandra*, die DNS in nachweisbaren Mengen enthalten.

4. *Ceratitis capitata* WIED.

STAMMER (1929) beschrieb ausführlich die Bakteriensymbiose der *Trypetiden* (*Diptera*) und darunter auch jene von *Ceratitis capitata* WIED. — In der Larve enthält der Darminhalt einzelne Symbionten verstreut, während sich im Darmlumen der älteren Imago riesige Mengen dieser kleinen Kurzstäbchen finden. Aus diesem Grunde habe ich ältere Imagines zur Klärung der Kernverhältnisse ihrer symbiontischen Bakterien herangezogen. Bei der HCl-Giemsa-Färbung (Hydrolysezeit 10—25 min und Färbezeit 35—45 min), wie auch bei der enzymatischen Methode (RN-ase zwischen 37—50° C während 10—20 min), wiesen die Symbiontenleiber fast durchwegs eine DNS-positive Reaktion auf. Nur bei einigen wenigen Bakterien war ein schwacher, rosa gefärbter Saum des Cytoplasmas zu erkennen (Abb. 27). Dabei gelang es infolge der

Kleinheit der symbiontischen Mikroorganismen nicht, einzelne Strukturen distinkter zur Darstellung zu bringen. Bei Desoxyribonuclease-Einwirkung verschwand diese intensive blaue Färbung schon nach einer halben Stunde vollkommen.

Der Beweis, daß DNS in diesen Bakterien in färbereich nachweisbaren Mengen vorhanden ist, wurde damit also eindeutig erbracht. Besondere Binnenstrukturen, wie ich sie bei den *Camponotus*-Symbionten fand, konnten hier nicht nachgewiesen werden.

Allgemein stellt man bei kokkenförmigen Bakterien runde, bei kleinen Stäbchen ovale Chromatineinschlüsse fest (vgl. DELAPORTE 1956, PIEKARSKI 1951 und WINKLER 1956). Solche kleinen Formen werden jedoch recht selten zu Kernäquivalentnachweisen herangezogen, da sie sich nur schlecht zur Darstellung von Intimstrukturen eignen.

Bei der Kleinheit der *Ceratitis*-Symbionten bestand wenig Aussicht auf ein Gelingen der Feinanalyse mit gewöhnlichen lichtmikroskopischen Methoden, doch ist zu erwarten, daß die Elektronenmikroskopie hier weitere Aufschlüsse bringen wird.



Abb. 27. Symbionten aus einer Imago von *Ceratitis capitata*. HCl-Giemsa-Färbung. Vergr. etwa 1500 ×

Abschließende Diskussion

Bereits BLOCHMANN entdeckte 1884, 1887 und 1892 in gewissen Zellen der Wandung des Mitteldarms und im noch nicht abgelegten Ei von *Camponotus* stäbchenförmige Gebilde, die er damals schon richtig als Bakterien erkannte. — 1918 und 1928 berichtete uns dann BUCHNER über die Lokalisation der Symbionten im Follikel epithel und in der wachsenden Ovocyte bis zum legereifen Ei, in welchem sie am hinteren Eipol angehäuft sind. Später beschrieb HECHT (1924) das Verhalten der Symbionten während der Embryonalentwicklung und das Schicksal der Bakteriocyten, die sich schließlich zwischen das Mitteldarmepithel einkleiden. — Lokalisation und Schicksal der Symbionten im Lebenszyklus des Wirtes waren damit in den wesentlichsten Punkten geklärt.

In dieser Arbeit wurde die feinere Morphologie der symbiontischen Mikroorganismen von *Camponotus* während der gesamten Entwicklung des Wirtes, vom Ei bis zum alternden Tier beobachtet. Dabei zeigte es sich, daß die Bakterien einem auffallenden Pleomorphismus unterliegen, der in erster Linie vom Alter des Wirtes abhängig ist, dann aber auch noch durch jahreszeitliche Einflüsse beeinträchtigt wird.

Wie bereits erwähnt, wurde auch bei Symbionten mehrerer anderer Insekten ein Formwandel beobachtet; doch wird in dieser Arbeit zum erstenmal der Formwechsel des chromatischen Apparates der Symbionten näher beschrieben. Dabei ergaben sich viele Parallelen zu den

bisher genauer analysierten Veränderungen der chromatischen Komponenten bekannter, leicht züchtbarer Bakterienstämme.

So wiesen RIPPEL-BALDES und BUSCH (1954) durch ihre quantitativ-analytischen Untersuchungen bei verschiedenen Mikroorganismen darauf hin, daß der DNS-Gehalt gegenüber dem RNS-Gehalt in Involutionsformen zunimmt, während der Gesamt-NS-Gehalt verringert wird. Sie schrieben: „Darin scheint sich auszudrücken, daß die Trägersubstanz der genetischen Eigenschaften, die DNS, offenbar auch das steuernde Moment ist, das zur Vergrößerung der Normalzelle zur Involutionzelle führt.“ — Wenn ich auch keine quantitativen Untersuchungen angestellt habe, so sind meine Befunde an *Camponotus*-Symbionten wohl auch in diesem Sinne zu deuten.

Auf die engen Beziehungen der DNS zum Stoffwechselgeschehen der Bakterienzelle weist BERGERSEN (1955) an den Knöllchenbakterien von *Trifolium subterraneum* L. hin. BERGERSEN beschreibt, wie nur stickstoffbindende „Bakteroide“ sog. Perinuclearregionen entwickeln, die in engster Beziehung zum Kernmaterial stehen. — Interessant wäre zu erfahren wie sich in dieser Hinsicht solche Symbionten der Insekten, welche für die Stickstoffassimilation verantwortlich gemacht werden [z. B. die Symbionten von *Pseudococcus citri* (FINK 1952), die Aphiden- und Homopteren-Symbionten (TÓTH, WOLSKY und BÁTORI 1942) und (TÓTH 1951)] im Wirt und in Reinkultur auf stickstoffhaltigem Nährboden verhalten.

Es mag vielleicht verwunderlich erscheinen, daß nicht bei allen von mir untersuchten Symbiontenformen mittels der von mir angewandten Methodik chromatische Strukturen nachgewiesen werden konnten. Auch LANHAM (1952) konnte bei den Aphiden-Symbionten mit Hilfe der Feulgenschen Nuclealreaktion keine Kernäquivalente nachweisen. Doch können wir nicht LEDERBERG (1952) folgen, wenn er schreibt: “if a preliminary report that they lack Feulgen-positive nuclei is substantiated and generalized, it is not likely that they can be identified with free-living microorganisms.” — Auch NICOL (1958) ließ sich auf Grund feulgennegativer Reaktionen an symbiontischen Mikroorganismen von *Pyrosoma atlanticum* PÉRON und *P. spinosum* HERDMAN zu der Ansicht verleiten, daß es sich bei diesen Leuchtsymbionten nicht um Mikroorganismen handeln könne.

Schon länger ist bekannt, daß sich die Kernäquivalente züchtbarer Bakterien nur in verschiedenen Entwicklungsstadien besonders gut darstellen lassen. WINKLER (1956), welche vielfach den Farbstoff für ein Mißlingen der Färbung verantwortlich macht, schreibt: „Häufiger als der Farbstoff ist aber das Objekt Ursache für das Mißlingen der Färbung. Denn ebenso wie sich die Chromosomen der höheren Zelle nur im Verlauf der Zellteilung, nicht aber im Ruhekern deutlich erkennen lassen, so

sehen wir auch gewisse Anordnungen der Nucleinsäuren innerhalb der Bakterien am besten in den wachsenden, sich schnell vermehrenden Zellen einer jungen Kultur aus dem Ende der Latenz- oder dem Beginn der log. Wachstumsphase. Auf die Bedeutung des Lebenszustandes der Zellen für derartige Untersuchungen haben vor allem NEUMANN (1941) und PIEKARSKI hingewiesen.“

KOCH hat schon 1925 beobachtet, daß in Kernen von Metazoenzellen die DNS nicht immer färberisch faßbar ist. Er suchte in wachsenden Eikernen von Geophiliden vergeblich nach feulgenpositiven Strukturen.

Wahrscheinlich liegen bei den symbiontischen Mikroorganismen, bei welchen bis heute noch keine Kernäquivalente zur Darstellung gebracht werden konnten (vgl. RESÜHR 1938, BEWIG und SCHWARTZ 1956) in der betreffenden Lebensphase besonders ungünstige Verhältnisse vor. Möglicherweise ist die DNS-haltige Substanz hier so fein verteilt, daß wir sie lichtoptisch nicht darstellen können. — 1951 wies PIEKARSKI schon darauf hin: „Liegen doch die zu erwartenden Innenstrukturen vielfach an der Grenze des Auflösungsvermögens der üblichen mikroskopischen Optik.“

Die Tatsache jedoch, daß bei manchen Symbionten keine DNS färberisch nachgewiesen werden konnte, ist noch kein Beweis gegen ihre Mikroorganismennatur. Dafür zeugen auch alle die Beobachtungen an zyklischen Symbiosen, wie sie in BUCHNERS Symbiosewerk ausführlich niedergelegt sind. Dazukommt, daß in solchen Fällen, in denen eine Kultur der Symbionten in vitro gelungen ist, auch schon genauere Aussagen über ihre physiologischen Leistungen möglich sind (vgl. FINK 1952).

KOTTER, der sich 1955 vergeblich bemühte, die Kernäquivalente der Pediculiden-Symbionten darzustellen, konnte auf Grund von Intravitalfärbungsversuchen (Redoxsysteme) die Lebenstätigkeit dieser Symbionten nachweisen. — Auch BEWIG und SCHWARTZ (1956) gelang bei Behandlung mit Methylenblau und Acridinorange der Nachweis, daß es sich bei den *Haematopinus*-Symbionten „fast ausschließlich um lebende Zellen handelt“.

Die Symbionteneliminationsversuche, wie sie erstmalig ASCHNER (1932) und später PUCHTA (1955) und BAUDISCH (1958) an *Pediculus* durchgeführt haben, führten zu der Erkenntnis, daß innigste stoffwechselphysiologische Zusammenhänge zwischen dem Wirtstier und seinen Symbionten bestehen. Entfernung der Symbionten bedeutet schwerste Wachstumschädigungen und frühzeitigen Tod für den Wirtsorganismus.

An günstigen Objekten jedoch, wie an den Symbionten von *Blattella germanica* (RIZKI 1954), *Periplaneta orientalis* (FRANK 1956) und anderen (von mir bereits angeführten Mikroorganismen), gelang der Nachweis der DNS.

Diese Arbeit zeigt, daß die Endo-Symbionten von *Camponotus* sehr viel Ähnlichkeit mit freilebenden Mikroorganismen haben und durchaus zu Vergleichen mit jenen herangezogen werden können.

Inwieweit elektronenmikroskopische Untersuchungen an ultradünnen Schnitten den Beweis dafür erbringen, daß der Begriff „Nucleoid“ durch den Begriff „Nucleus“ (PIEKARSKI und GIESBRECHT 1957) ersetzt werden kann, muß an Symbionten noch in eingehender Arbeit nachgewiesen werden.

Den ersten Versuch dazu führten MEIER und FRANK (1957) an den Symbionten der Küchenschabe durch, ohne jedoch die an züchtbaren Bakterien üblichen Bilder zu erhalten. — Es wäre erwünscht, die licht-optischen Beobachtungen mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen an züchtbaren bekannten Bakterien zu vergleichen und dann dieselbe Methode auf die Symbionten zu übertragen.

Zusammenfassung

1. Die Arbeit befaßt sich mit dem Nachweis von „Kernäquivalenten“ der Symbionten verschiedener Insekten. Dazu wurden sowohl Symbiontenausstriche als auch Serienschnitte durch die symbiontischen Organe herangezogen.

2. Intravitalfärbungen an den *Camponotus*-Symbionten brachten die Bestätigung, daß die Symbionten während ihrer Entnahme aus den Mycetocyten noch lebend waren.

3. Desoxyribonucleinsäure (DNS), ein charakteristischer Bestandteil der typischen Bakterien, konnte in den *Camponotus*-Symbionten mittels verschiedener Methoden färberisch sowie mit dem Phasenkontrastmikroskop nachgewiesen werden.

4. Erstmals konnte im Lebenszyklus symbiontischer Mikroorganismen das Verhalten der chromatischen Einschlüsse genauer studiert werden. Ähnliche Chromatinstrukturen sind bekanntlich von verschiedenen Autoren an Kulturbakterien beobachtet worden.

5. Für die Morphologie der *Camponotus*-Symbionten ist ein ausgeprägter Pleomorphismus bezeichnend. Es wurden kleine Stäbchen, Löffeln oder Tennisschlägern gleichende Formen, kugelig-amorphe Gebilde, sowie lange Fäden, welche auch Verzweigungen bilden können, beobachtet.

6. Mit den Wirtstieren altern auch die Symbionten. Bei den Bakterien von *Camponotus* machen sich Alterserscheinungen durch das Schwinden der färberisch nachweisbaren Chromatinsubstanz bemerkbar, was die Degeneration einleitet.

7. Die innigen topographischen Beziehungen zwischen dem Wohnsitz der Symbionten im Mitteldarm und den Ovarien machen einen unmittelbaren Übertritt der Bakterien aus dem Darm in die Eiröhren der älteren

Arbeiterpuppe von *Camponotus* wahrscheinlich. Der Ovarialinfektion geht in der jungen und mittleren Puppe ein starker Vermehrungsstoß der Symbionten in den Mycetocyten voraus.

8. *Camponotus*-Symbionten werden primär vom Entwicklungsverlauf des Wirtes und sekundär von jahreszeitlichen Einwirkungen beeinflusst.

9. In den schlauchförmigen Hauptsymbionten von *Aphrophora salicis* konnten in den verschiedenen Larvenstadien des Wirtes bis zur frisch geschlüpften Imago mit den gleichen Methoden, wie sie bei den *Camponotus*-Symbionten angewandt wurden, *keine* Kernäquivalente nachgewiesen werden.

10. Mit Hilfe von mikrochemischen Methoden wurden in den Hauptsymbionten von *Aphrophora salicis* Eiweiß und Kohlenhydrate nachgewiesen.

11. Die Untersuchungen an den Symbionten von *Pediculus vestimenti* bestätigen für die Eilarven die Ergebnisse KOTTERS. Auch bei den Symbionten aus allen anderen Entwicklungsstadien der Kleiderlaus konnten *keine* als Kernäquivalente anzusprechende Differenzierungen gefunden werden.

12. In den schlauchförmigen, mit Vakuolen durchsetzten Symbionten aus frisch geschlüpften Imagines von *Oryzaephilus surinamensis* wurden kleine, chromatische Körnchen dargestellt, welche zum Teil DNS enthalten.

13. Bei den Symbionten aus den Germanien von *Calandra oryzae* wurde *keine* DNS nachgewiesen.

14. Die Symbionten von *Ceratitis capitata* enthalten DNS, die durch Desoxyribonuclease völlig abgebaut werden konnte.

Literatur

Die mit * bezeichneten Schriften standen mir nur in Referaten zur Verfügung!

ASCHNER, M.: Experimentelle Untersuchungen über die Symbiose der Kleiderlaus. Naturwiss. **20**, 501—505 (1932). — BARTMANN, K., u. W. HÖPKEN: Zur Frage des sog. unvollständigen L-Zyklus. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **166**, 30—42 (1956). — BAUDISCH, K.: Beiträge zur Cytologie und Embryologie einiger Insektensymbiosen. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **47**, 436—488 (1958). — BAUER, H.: Die Feulgensche Nuklealfärbung in ihrer Anwendung auf cytologische Untersuchungen. Z. Zellforsch. **15**, 225—247 (1932). — BENDER, H.: Studien zum L-Cyklus der Bakterien (nach Untersuchungen an *Proteus vulgaris* unter dem Einfluß von Penicillin). Arch. Mikrobiol. **28**, 18—23 (1957). — Studien zum Gestaltwandel der Bakterien (Bildung sarcina-ähnlicher Formen bei einem gramnegativen, unbeweglichen Stäbchen). Arch. Mikrobiol. **28**, 34—44 (1957). — BERGERSEN, F. J.: A probable growth cycle in *Bacillus megaterium*. J. gen. Microbiol. **9**, 26—29 (1953). — The cytology of bacteroids from Root Nodules of *Subterranean Clover* (*Trifolium subterraneum* L.). J. gen. Microbiol. **13**, 411—419 (1955). — BEWIG, F., u. W. SCHWARTZ: Untersuchungen über die Symbiose von Tieren mit Pilzen und Bakterien. Arch. Mikrobiol. **24**, 174—208 (1956). — BISSET,

K. A.: Nuclear reorganization in nonsporing bacteria. *J. Hyg. (Lond.)* **46**, 173—175 (1948a). — Observations upon the bacterial nucleus. *J. Hyg. (Lond.)* **46**, 264—266 (1948b). — Observations upon the cytology of *Corynebacteria* and *Mycobacteria*. *J. gen. Microbiol.* **3**, 93—96 (1949). — BLOCHMANN, F.: Über die Metamorphose der Kerne in den Ovarialeiern und über den Beginn der Blastodermbildung bei den Ameisen. *Verh. naturhist.-med. Verein Heidelberg, N.F.* **3** (1884). — Über das regelmäßige Vorkommen von bakterienähnlichen Gebilden in den Geweben und Eiern verschiedener Insekten. *Z. Biol., N.F.* **VI** **24**, 1—16 (1887). — Über das Vorkommen bakterienähnlicher Gebilde in den Geweben und Eiern verschiedener Insekten. *Zbl. Bakt.* **11**, 234—240 (1892). — BOIVIN, A., R. TULASNE, R. VENDRELY et R. MINCK: Le noyau des bactéries. *Cytologie et cytochimie des bactéries normales et des traitées par la penicilline. Arch. Sci. physiol.* **1**, 307—323 (1947). — Le noyau des bactéries. *Presse méd.* (56. Année Nr 37) **1948**, 440—441. — BRANDES, J., W. SCHWARTZ u. W. FLAIG: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Struktur der Kernäquivalente von Bakterien. *Zbl. Bakt., II. Abt.* **108**, 672—687 (1955). — BRAULKE, H.: Form- und Wachstumsveränderungen bei Vibrionen. *Z. Hyg.* **115**, 25—46 (1933). — BRAUN, H., ST. BERG, S. KESSLER u. P. MAVROIDI: Über die Anormomorphogenese bei Bakterien. *Med. Mschr.* **8**, H. 7 446—456 (1954). — BRAUN, H., u. F. YALIM: Zur Kenntnis der Chromatinkörperchen der Bakterien. *Istanbul Serir.* **30**, Nr 9 (1948). — Beiträge zur Kenntnis der Chromatinkörperchen der Bakterien. *Microbiol.* **2**, No 2, 3—14 (1949). — BRINGMANN, G.: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über die cytologische Natur der Granula von *Corynebacterium diphtheriae*. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **156**, 493—502 (1951a). — Elektronenmikroskopische Studien über Kernäquivalente und Zellorganisation von *B. polymyxa*. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* **156**, 547—556 (1951b). — BROHMER, P.: Fauna von Deutschland. Heidelberg: Quelle & Meyer 1953. — BUCHNER, P.: Studien an intrazellulären Symbionten. I. Die Symbionten der Hemipteren. *Arch. Protistenk.* **26**, 1—116 (1912). — Vergleichende Eistudien. I. Die akzessorischen Kerne des Hymenoptereneies. *Arch. mikr. Anat., Abt. II.* **91**, 70—88 (1918). — Studien an intrazellulären Symbionten. 5. Die symbiotischen Einrichtungen der Zikaden. *Z. Morph. u. Ökol. Tiere* **4**, 88—245 (1925). — Ergebnisse der Symbioseforschung. I. Die Übertragungseinrichtungen. *Ergebn. Biol.* **4**, 1—129 (1928). — Endosymbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen. Basel u. Stuttgart: Birkhäuser 1953. — CARRÈRE, L., et J. ROUX: Obtention in vivo des formes L de *Salmonella typhimurium*. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **234**, 1647—1649 (1952). — CASSEL, W. A.: The use of perchloric acid in bacterial cytology. *J. Bact.* **59**, 185 (1950). — A procedure for the simultaneous demonstration of the cell walls and chromatinic bodies of bacteria. *J. Bact.* **62**, 239—241 (1951). — CASSEL, W. A., and W. G. HUTCHINSON: Fixation and staining of the bacterial nucleus. *Stain Technol.* **30**, 105—118 (1955). — CHANCE, H. L.: A nuclear stain for *E. coli* and related organisms. *Stain Technol.* **29**, 185—188 (1954). — Hydrogen chloride gas for effecting staining of internal structures in *Escherichia coli*. *Stain Technol.* **30**, 53—58 (1955). — A study of bacterial substances stainable by the hydrogen chloride method. *J. Bact.* **71**, 285—289 (1956). — Nuclear division in *E. coli* as revealed by acid fuchsin. *J. Bact.* **74**, 67—70 (1957). — CHAPMAN, G. B., and A. J. KROLL: Electronmicroscopy of ultrathin sections of *Spirillum serpens*. *J. Bact.* **73**, 63—71 (1957). — DAVIS, J. C., and S. MUDD: Cytological effects of ultraviolet radiation and asazirine on *Corynebacterium diphtheriae*. *J. gen. Microbiol.* **14**, 527—532 (1956). — DELAPORTE, B.: Observations on the cytology of Bacteria. *Advanc. Genet.* **3**, 1—32 (1950). — État actuel de nos connaissances sur la cytologie bactérienne. Sième Congr. Intern. de Botanique. Paris, 1954. — État actuel de nos connaissances sur la structure des Bactéries.

Bull. Soc. bot. France **103**, 521—548 (1956). — DIENES, L., and H. J. WEINBERGER: The L-form of bacteria. Bact. Rev. **15**, 245—288 (1951). — DUGUID, J. P.: The influence of cultural conditions on the morphology of *Bacterium aerogenes* with reference to nuclear bodies and capsule size. J. Path. Bact. **60**, 265—274 (1948). — DYAR, M. T.: A cell wall stain employing a cationic surface-active agent as a mordant. J. Bact. **53**, 498 (1947). — EIDMANN, H.: Zur Kenntnis der Roßameise *Camponotus herculeanus* L. Z. angew. Entomol. **14**, 224—253 (1928). — ESCHERICH, K.: Die Forstinsekten Mitteleuropas. Bd. V: Hymenoptera und Diptera. Berlin: Paul Parey 1942. — FAIRMAN, M.: Nuclear morphology of *Bacillus cereus* grown on partially defined media. J. gen. Microbiol. **15**, 257—260 (1956). — FEULGEN, R., u. H. ROSSENBECK: Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typ der Thyminnucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. Z. phys. Chem. **135**, 203 (1924). — FINK, R.: Morphologische und physiologische Untersuchungen an den intracellulären Symbionten von *Pseudococcus citri* Risso. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **41**, 78—146 (1952). — FLEMING, A., A. VOUREKA, I. R. H. KRAMER und W. H. HUGHES: The morphology and mutability of *Proteus vulgaris* and other organisms cultured in the presence of penicillin. J. gen. Microbiol. **4**, 257—269 (1950). — FRANK, W.: Entfernung der intrazellulären Symbionten der Küchenschabe (*Periplaneta orientalis*) durch Einwirkung verschiedener Antibiotica unter Berücksichtigung der Bakterien. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **44**, 329—366 (1956). — GARDNER, A. D.: Morphological effects of penicillin on bacteria. Nature (Lond.) **146**, 837—838 (1940). — GIESBRECHT, P.: Zytologische Untersuchungen an Bakterien. Diss. Bonn 1957. — GIRBARDT, M., u. U. TAUBENECK: Zur Frage der Zellwandfärbung bei Bakterien. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **162**, 310—313 (1955). — GOETSCH, W.: Vergleichende Biologie der Insektenstaaten. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft 1940. — Die Staaten der Ameisen. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1953. — GRIEDER, F., L. NEPP u. R. MEIER: Beitrag zur Charakterisierung des Wirkungstypus antibakterieller Stoffe. Schweiz. Z. Path. **17**, 703—719 (1954). — HAAS, J.: Physiologie der Zelle. Berlin: Gebrüder Bornträger 1955. — HAGEDORN, H.: Beiträge zur Cytologie und Morphologie der Actinomyceten. Zbl. Bakt., II. Abt. **108**, 353—375 (1955). — HAUPT, H.: Biologie und Systematik der europäischen Schaumzikaden. „Aus der Heimat“ Mschr. Dtsch. Lehrervereins für Naturkunde E.V., 35. Jhrg., S. 1—28, 1922. — HECHT, O.: Embryonalentwicklung und Symbiose bei *Camponotus ligniperda*. Z. wiss. Zool. **122**, 173—204 (1924). — HEUMANN, W.: Der Sexualzyklus sternbildender Bakterien. Arch. Mikrobiol. **24**, 362—395 (1956). — HOLMAN, R. A.: Development of the long forms of bacteria. Nature (Lond.) **178**, 424—425 (1956). — HUBER, L.: Morphologische und physiologische Untersuchungen an der Wanze *Mesocerus marginatus* L. und ihren Symbionten. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **46**, 433—480 (1957). — HUGER, A.: Experimentelle Untersuchungen über die künstliche Symbiontenelimination bei Vorratsschädlingen: *Rhizopertha dominica* F. (*Bostrychida*.) und *Oryzaephilus surinamensis* L. (*Cucujidae*). Z. Morph. u. Ökol. Tiere **44**, 626—701 (1956). — HUNTER, M. E.: Studies on the nucleus of giant cells of *micrococcus cryophilus*. Exp. Cell Res. **9**, 221—231 (1955). — IMSENECKI, A.: Die Feulgensche Nuclealreaktion bei Bakterien und Hefen. Zbl. Bakt., II. Abt. **94**, 330—336 (1936). — JUHASZ, St. E., and E. M. MAKIEWICZ: Atypical forms of *Tubercle Bacilli* (strain B.C.G.). Nature (Lond.) **181**, 929—930 (1958). — KELLENBERGER, E.: Les formes caractéristiques des nucleoides de *E. coli* et leurs transformations dues à l'action d'agents mutagenes-inducteurs et de bacteriophages. VI. Congr. Int. di Microbiol. Symposium, S. 45—66. Roma: Fondazione E. Paterno 1953. — KELLENBERGER, E., et A. RYTER: Contribution à l'étude du noyau bactérien. Schweiz. Z. Path. **18**, 1122—1137 (1955). — KESSLER,

S.: Beiträge zur Wirkung von Caesiumsalzen auf Bakterien. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **165**, 469—485 (1956). — KLIENEGER-NOBEL, E.: Origin development and significance of L-forms in bacterial cultures. J. gen. Microbiol. **3**, 434—443 (1949). — Chromatinstrukturen der Bakterien und ihre biologische Bedeutung. Schweiz. Z. Path. **10**, 480—487 (1947). — The L-cycle: a process of regeneration in bacteria. J. gen. Microbiol. **5**, 525—530 (1951). — KNAYSI, G.: The structure, composition and behaviour of the nucleus in *Bac. cereus*. J. Bact. **69**, 118 (1954). — KNÖLL, H.: Zur Anwendung der Phasenkontrastmikroskopie in der Bakteriologie. Zeiss-Nachrichten **5**, 38 (1944). — KNÖLL, H., u. K. ZAPP: Untersuchungen zum Problem des Bakterienzellkerns. I. Mitteilung. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **157**, 389—406 (1951). — Untersuchungen zum Problem des Bakterienzellkerns. II. Mitt. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **161**, 241—258 (1954). — KNÖSEL, D.: Elektronenoptische Untersuchungen zur Kernstruktur von *Agrobacterium stellulatum*. Zbl. Bakt., II. Abt. **110**, 601—611 (1957). — KNÖSEL, D., u. J. GÜNTHER: Zur Karyologie der Bakterien. Fortgeführte elektronenoptische Studien an *Agrobacterium*-Arten. Zbl. Bakt., II. Abt. **111**, 161—168 (1958). — KOCH, A.: Morphologie des Eiwachstums der Chilopoden. Z. Zellforsch. **2**, 293—346 (1925). — Über das Vorkommen von Mitochondrien in Mycetocyten. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **19**, 259—290 (1930). — Die Symbiose von *Oryzaephilus surinamensis* L. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **23**, 389—424 (1931). — Symbiosestudien. I. Die Symbiose des Splintkäfers *Lyctus linearis* Goeze. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **32**, 92—136 (1936). — Symbiosestudien. II. Experimentelle Untersuchungen an *Oryzaephilus surinamensis* L. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **32**, 137—180 (1936). — Das Verhältnis zwischen Symbiont und Wirt. Verh. der Dtsch. Zool. Ges. in Erlangen 1955. — Die physiologische Bedeutung der Symbionten für den Wirtsorganismus. Verh. der Dtsch. Ges. für Inn. Medizin, 63. Kongr., 1957. — KOLB, G.: Über die Kernverhältnisse der Symbionten von *Camponotus ligniperda* Latr., *Aphrophora salicis* de G. u. *Pediculus vestimenti* Burm. Naturwiss. **44**, 546 (1957). — KOTTER, L.: Bakteriologische und mikrochemische Untersuchungen an der Magenscheibe von *Pediculus vestimenti* Burm. Arch. Mikrobiol. **23**, 38—66 (1955). — KRIEG, A.: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Kernäquivalenten in Bakterien. Naturwiss. **40**, 414 (1953). — Zur Zytologie und Enzymatik der Bakterien. Z. Naturforsch. **9b**, 342—348 (1954). — Nachweis kernäquivalenter Strukturen bei Bakterien in vivo. I. Mitt. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **161**, 241—259 (1954). — * KUCELA, J.: Zakonisoski života. Prag 1930. Ref. Zbl. Bakt., I. Abt. Ref. **102**, 133 (1931). — LAMATER, E. D. DE: A staining and dehydrating procedure for the handling of microorganisms. Stain Technol. **26**, 199—204 (1951). — Evidence for the occurrence of true mitosis in bacteria. Science **113**, 477 (1951). — Cytology of bacteria. Part. II. The bacterial nucleus. Ann. Rev. Microbiol. **8**, 23—46 (1954). — LANHAM, U. N.: Observations on the supposed intracellular symbiotic microorganisms of aphids. Science **115**, 459—460 (1952). — LARK, K. G., and O. MAALØE: The induction of cellular and nuclear division in *Salmonella typh.* by means of temperature shifts. Biochim. biophys. Acta **15**, (1954). — LEDERBERG, J.: Cell genetics and hereditary symbiosis. Physiol. Rev. **32**, 403—430 (1952). — LEINER, M., u. M. WOHLFEIL: Das symbiontische Bakterium in *Pelomyxa palustris* Greef. II. Naturwiss. **40**, 557 (1953). — LEINER, M., M. WOHLFEIL u. O. SCHMIDT: Das symbiontische Bakterium in *Pelomyxa palustris* Greef. I. Z. Naturforsch. **6b**, 158—170 (1951). — *Pelomyxa palustris* Greef. Ann. Sci. natur., Zool. **16**, 537—594 (1954). — LEVADITI, C., et J. HENRY-EVENO: Nouvelle méthode permettant l'étude des modifications morphologiques et tinctoriales des bactéries en présence d'antibiotiques et en fonction de leur dénombrement. C. R. Acad. Sci. (Paris) **230**, 792—794 (1950). — LILIENSTERN, M.: Beiträge zur Bakteriensymbiose der Ameisen. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **26**, 110—134 (1932). —

- LIPP, W.: Histochemische Methoden. Lieferg. I. München: Oldenbourg 1954. —
- * MALMGREN, B., u. C. HEDEN: Studies of the nucleotide metabolism of bacteria. I. Ultraviolet microspectrography as an aid in the study of the nucleotide content of bacteria. II. Aspects of the problem of the bacterial nucleus. Acta path. microbiol. scand. **24**, 418—504 (1947). — MANSOUR, K.: Preliminary studies on the bacterial cell-mass (accessory cell-mass) of *Calandra oryzae* L.: The rice weevil. Quart. J. micr. Sci. **73**, 421—436 (1930). — On the so-called symbiotic relationship between coleopterous insects and intracellular microorganisms. Quart. J. micr. Sci. **77**, 255—271 (1934). — MASON, D. J., and D. POWELSON: Nuclear division as observed in live bacteria by a new technique. J. Bact. **71**, 474—479 (1956). — McDONALD, M., and B. KAUFMAN: The degradation by ribonuclease of substrates other than ribonucleic acid. J. Histochem. Cytochem. **2**, 387—394 (1954). — MEIER, G., u. W. FRANK: Elektronenmikroskopische Studien zur intracellulären Symbiose verschiedener Insekten. Z. Zellforsch. **47**, 29—42 (1957). — MEYER, A.: Orientierende Untersuchung über die Verbreitung, Morphologie und Chemie des Volutins. Bot. Ztg. **62**, 113—153 (1904). — MEYER-PIETSCHMANN, K.: Zur Zellkernfrage bei den Bakterien. Biol. Zbl. **65**, 84 (1946). — MILOVIDOV, P. F.: Ergebnisse der Nuclealfärbung bei den Myxobakterien und einigen anderen Bakterien. Arch. Mikrobiol. **6**, 475—509 (1935). — MINSVAGE, E. J.: A permanent mounting procedure for bacteria. Stain Technol. **30**, 231—233 (1955). — MOLISCH, H.: Mikrochemie der Pflanze. Jena: Gustav Fischer 1923. — MUDD, ST.: Cytology of bacteria. Part I. The bacterial cell. Ann. Rev. Microbiol. **8**, 1—22 (1954). — MUDD, ST., and A. G. SMITH: Internal structure and nuclei in cells of *Escherichia coli* as shown by improved electronmicroscopic techniques. J. Bact. **57**, 319 (1949). — MUDD, ST., A. G. SMITH, J. HILLIER and J. BEUTNER: Electron and light microscopic studies of bacterial nuclei. J. Bact. **60**, 635 (1956). — * NEIPP, L.: De l'influence de divers cations sur le croît microbien. Thèse Doct. ès Sci. Paris 1937. — NEUMANN, F.: Die Frage nach dem Kern der Bakterien und ihre Beantwortung mit Hilfe der Nuclealfärbung. Berl. tierärztl. Wschr. **1930**, 101—102. — Untersuchungen zur Erforschung der Kernverhältnisse bei den Bakterien. Zbl. Bakt., II. Abt. Orig. **103**, 385—400 (1941). — NICOL, J. A. C.: Observations on luminescence in pelagic animals. J. Mar. biol. Ass. U. K. **37**, 705—752 (1958). — ONISI, M., and T. KATO: Removal of ribonucleic acid from bacterial cells by dilute salt solutions. Stain Technol. **30**, 173—178 (1955). — PARVIS, D.: Sulle modificazioni provocate nei nuclei batterici dai cosiddetti „Veleni Mitotici“. Boll. Ist. sierroter. milan. **33**, 465—469 (1954). — PETERS, D., u. R. WIGAND: Enzymatisch elektronenoptische Analyse der Nukleinsäureverteilung, dargestellt an *E. coli* als Modell. Z. Naturforsch. **8b**, 180—192 (1953). — PIEKARSKI, G.: Cytologische Untersuchungen an Paratyphus- und Colibakterien. Arch. Mikrobiol. **8**, 428—439 (1937). — Über kernähnliche Strukturen bei *Bac. mycoides* Flügge. Arch. Mikrobiol. **11**, 406—431 (1940). — Zum Problem des Bakterienzellkerns. Ergebn. Hyg. Bakt. **26**, 333—364 (1949). — Haben Bakterien einen Zellkern? Naturwiss. **37**, 201—205 (1950). — Die Zellkernäquivalente der Bakterien. Colloqu. Dtsch. Ges. physiolog. Chemie, S. 83—101, 1951. — PIEKARSKI, G., u. P. GIESBRECHT: Zytologische Untersuchungen an *Bac. megatherium* mit Hilfe ultradünner Schnitte. Naturwiss. **43**, 89—90 (1956). — PIEKARSKI, G., u. G. M. PONTIERI: Über Feinstrukturen in den kernähnlichen Körpern von *E. coli*. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **165**, 242—243 (1956). — PIERANTONI, U.: L'organo simbiotico nello sviluppo di *Calandra oryzae* L. R. Accad. Sci. fis. mat. (Napoli) **35** (1927). — * L'organo simbiotico di *Oryzaephilus (Silvanus) surinamensis* L. R. Accad. Lincei **9** (6) (1929). — Origine e sviluppo degli organi simbiotici di *Oryzaephilus (Silvanus) surinamensis* L. Atti R. Accad. Sci. fis. mat. (Napoli) **18** (1930). — PIETSCHMANN, K., u. A. RIPPEL:

Zur Zellkernfrage bei den Bakterien. Untersuchungen mit Hilfe der Feulgenschen Nuclealreaktion. Arch. Mikrobiol. **3**, 422—452 (1932). — * POKROWSKAJA, M.: Cytologische Beobachtungen über den Dissoziationsprozeß der Pestbacillen. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **119**, 353 (1931). — PONTIERI, G.: Über die sog. "large bodies" von *E. coli*. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **165**, 524—530 (1956). — PREUNER, R., u. J. v. PRITZWITZ u. GAFFRON: Über feulgenpositive Körper in Bazillen und Bakterien und ihr Verhalten gegenüber Streptomycin und Penicillin. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **157**, 244—250 (1952). — PRITZWITZ u. GAFFRON, J. v.: Zum Gestaltwandel der Bakterien. Naturwiss. **40**, 590—594 (1953). — PUCHTA, O.: Experimentelle Untersuchungen über die Bedeutung der Symbiose der Kleiderlaus *Pediculus vestimenti* Burm. Z. Parasitenk. **17**, 1—40 (1955). — Züchtungsversuche an den Symbionten von *Pediculus vestimenti* Burm., nebst physiologischen und morphologischen Beobachtungen. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **44**, 416—441 (1956). — PULVERTAFT, R. S. V.: The effect of antibiotics on growing cultures of *bacterium coli*. J. Path. Bact. **64**, 75—89 (1952). — RESÜHR, B.: Untersuchungen über die Symbiose von Tieren mit Pilzen und Bakterien (*Phlaenus spumarius*). Arch. Mikrobiol. **9**, 31 (1938). — RIES, E.: Die Symbiose der Läuse und Federlinge. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **20**, 233 (1931). — RIPPPEL-BALDES, A., u. G. BUSCH: Über den Gehalt von Involutionenformen der Mikroorganismen an Nucleinsäuren und Aminosäuren. Nachr. Akad. Wiss. Göttingen, math.-phys. Kl. IIb, Biol.-physiol.-chem. Abt. Nr 4, 23—36 (1954). — RIZKI, M. T. M.: Desoxyribose nucleic acid in the symbiotic microorganisms of the cockroach, *Blattella germanica*. Science **120**, 35—36 (1954). — ROBINOW, C. F.: A study of the nuclear apparatus of bacteria. Proc. roy. Soc. B **130**, 299 (1942). — Addendum aus "The Bacterial Cell" von DUBOS. Harvard Univ. 1947. — RUSKA, H., G. BRINGMANN u. J. NECKEL: Über die Entwicklung sowie den morphologischen und zytochemischen Aufbau von *Mycobacterium avium* (Chester). Z. wiss. Mikr. **60**, 425—447 (1952). — ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. München 1948. — SANDRITTER, W.: Über den qualitativen und quantitativen histochemischen Nachweis der Nukleinsäure und ihre Funktion in der Zelle. Röntgen- u. Lab.-Prax. **5/6**, 18 (1953). — SCHAEDE, R.: Zum Vorkommen chromatischer Substanz bei Actinomyceten und Bakterien. Arch. Mikrobiol. **10**, 473 (1939). — SCHEINERT, W.: Symbiose und Embryonalentwicklung bei Rüsselkäfern. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **27**, 76—128 (1933). — SCHMIDT, H.: Über Dimorphie bei Milzbrand-, Wurzelbacillen und Sarcinen. Z. Hyg. Infekt.-Kr. **115**, 54—62 (1933). — SCHNEIDER, G.: Beiträge zur Kenntnis der symbiotischen Einrichtungen der Heteropteren. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **36**, 595—644 (1940). — SCHNEIDER, H.: Morphologische und experimentelle Untersuchungen über die Endosymbiose der Korn- und Reiskäfer (*Calandra granaria* L. und *Calandra oryzae* L.). Z. Morph. u. Ökol. Tiere **44**, 555—625 (1956). — SCHORR, H.: Zur Verhaltensbiologie und Symbiose von *Brachypelta aterrima* Först (*Cydnidae*, Heteroptera). Z. Morph. u. Ökol. Tiere **45**, 561—602 (1957). — SCHRÖDER, C.: Handbuch der Entomologie, Bd. I. Jena: Gustav Fischer 1928. — SCHÜLER, R.: Die vitale Darstellung der Chromatinstrukturen von *Bact. coli* mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes. Protistenk. **99**, 227—251 (1954). — STAMMER, H. J.: Die Bakteriensymbiose bei den *Trypetiden* (*Diptera*). Z. Morph. u. Ökol. Tiere **15**, 481—523 (1929). — Studien an Symbiosen zwischen Käfern und Mikroorganismen. I. Die Symbiose der Donacien (*Coleopt. Chrysomel.*). Z. Morph. u. Ökol. Tiere **29**, 585—608 (1935). — II. Die Symbiose des *Bromius obscurus* L. und der *Cassida*-Arten. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **31**, 682—697 (1936). — STAPP, C.: Der Pflanzenkrebs und sein Erreger *Pseudomonas tumefaciens*. XI. Mitt. Cytologische Untersuchungen des bakteriellen Erregers. Zbl. Bakt., II. Abt. **105**, 1—14 (1942). — STAPP, C., u. H. BORTELS: II. Mitt. Über den Lebenskreislauf von *Pseudomonas tumefaciens*.

Z. Parasitenk. **4**, 101—125 (1931). — STAPP, C., u. D. KNÖSEL: Fortgeführte Untersuchungen über den Entwicklungszyklus und die Karyologie sternbildender Bakterien. Zbl. Bakt., II. Abt. **109**, 416—428 (1956). — STEMPEN, H.: Demonstration of the chromatinic bodies of *E. coli* and *Proteus vulgaris* with aid of the phase contrast microscope. J. Bact. **60**, 81—87 (1950). — STERZL, J.: Morphological variability of the nuclear substance and genetic changes induced by colchicine in *E. coli*. Nature (Lond.) **163**, 28 (1949). — STILLE, B.: Cytologische Untersuchungen an Bakterien mit Hilfe der Feulgen-Nuklealreaktion. Arch. Mikrobiol. **8**, 125—148 (1937). — STITZ, H.: In DAHL, Tierwelt Deutschlands. 37. Teil: Ameisen oder Formicidae. 1939. — *TARSIA IN CURIA, I.: Nuove osservazioni sull'organo simbiotico di *Calandra eryzae* Linn. Arch. Zool. ital. **18**, 247—264 (1933). — *THOMAS, A.: Sur la cytologie de *Bacillus Calmette* no. spec. C. R. Soc. Biol. (Paris) **105**, 859 (1930). — TÓTH, L., A. WOLSKY u. M. BATORI: Stickstoffbindung aus der Luft bei den Aphiden und bei den Homopteren. Z. vergl. Physiol. **30**, 300—320 (1942). — TÓTH, L.: Die Rolle der Mikroorganismen in dem Stickstoff-Stoffwechsel der Insekten. Zool. Anz. **146**, 191—197 (1951). — TULASNE, R., and R. VENDRELY: Demonstration of bacterial nuclei with ribonuclease. Nature (Lond.) **160**, 225—226 (1947). — TULASNE, R., et R. MINCK: La formation des corps larges chez les bactéries et la signification. C. R. Acad. Sci. (Paris) **226**, 2186—2188 (1948). — *VOIT, K.: Über das Verhalten der Bakterien zur Nuclealfärbung. Z. ges. exp. Med. **47**, 183—192 (1925). — WALCZUCH, A.: Studien an Coccidensymbionten. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **25**, 623—729 (1932). — WEBB, R. B.: Zellwandfärbung von Bakterien. J. Bact. **67**, 252—253 (1954). — WHITFIELD, J. F., and R. G. E. MURRAY: The effects of the ionic environment on the chromatin structures of bacteria. Canad. J. Microbiol. **2**, 245—260 (1956). — WIDRA, A.: Studies on the cytochemistry of bacteria. J. Bact. **71**, 689—702 (1956). — WINKLER, A.: Die Bakterienzelle. Ein Überblick über den gegenwärtigen Stand unseres Wissens. Stuttgart: Gustav Fischer 1956. — WINKLER, A., u. M. KNOCH: Zur Fixierung von Bakterienpräparaten. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. **157**, 239—243 (1951). — YUASA, A.: Cytological studies on Mycobacterium. Cytologia. Int. J. Cytology **20**, 96—99 (1955). — YUASA, A., T. HIRANO and O. SUZUKI: Studies in the cytology of Mycobacterium. II. Nuclear division. Jap. J. Genet. **29**, 223—227 (1954). — ZOLLINGER, H. U.: Zur Technik der intravitalen Phasenkontrastmikroskopie. Experientia (Basel) **8**, 78 (1952).

Dr. GERTRUD KOLB, München 2, Luisenstraße 14,
Zoologisches Institut der Universität

LEBENS LAUF

Ich, Gertrud, Maria, Hedwig Kolb, wurde am 6. 11. 1930 als Tochter des Direktors Dr. rer. pol. August Kolb und seiner Ehefrau Hedwig Kolb, geborene Zwickler, in Konstanz am Bodensee geboren. Die Volksschule besuchte ich in Frankfurt/Main und später in Hanau-Kesselstadt. 1940 trat ich in die Oberrealschule in Hanau/Main ein und mußte infolge des Krieges mehrfach Wohnort und Schule wechseln. Am Ellenrieder-Gymnasium in Konstanz legte ich im Juni 1950 die Reifeprüfung ab. — Im Wintersemester 1950/51 immatrikulierte ich mich an der Universität in Mainz in der Naturwissenschaftlichen Fakultät und begann mein Studium in den Fächern Chemie, Mathematik und Mineralogie. Vom Sommersemester 1951 bis zum Wintersemester 1952/53 setzte ich mein Studium an der Universität Basel in den Fächern Botanik, Chemie, Mineralogie und Physik fort und schloß dort die qualitativ analytische anorganische Ausbildung für Chemiker ab. Im Sommersemester 1953 immatrikulierte ich mich an der Universität München mit der Fächerzusammenstellung Bakteriologie, Biologie und Chemie. — Auf Anregung von Herrn Professor Dr. A. Koch begann ich 1955 eine wissenschaftliche Arbeit über das Thema: „Untersuchungen über die Kernverhältnisse und morphologischen Eigenschaften symbiontischer Mikroorganismen bei verschiedenen Insekten.“ — Als Studienabschluß ist die Promotion vorgesehen.

